





TUMOUR NECROSIS FACTOR BINDING LIGANDS

Publication number: DE69027121 (T2)
Publication date: 1996-11-14
Inventor(s): RATHJEN DEBORAH [AU]; ASTON ROGER [AU]
Applicant(s): PEPTIDE TECHNOLOGY LTD [AU]
Classification:
- **international:** C12N15/09; A61K38/00; A61K45/00; A61K47/48; A61P35/00; A61P35/02; C07K14/47; C07K16/18; C07K16/24; C12N15/02; C12P21/08; C12N5/10; C12N15/09; A61K38/00; A61K45/00; A61K47/48; A61P35/00; C07K14/435; C07K16/18; C12N15/02; C12P21/08; C12N5/10; (IPC1-7): C12P21/08; C07K16/18; C07K16/24
- **European:** C07K16/24B; A61K47/48T; A61K47/48T2C12K
Application number: DE19906027121T 19900807
Priority number(s): AU1989PJ05662 19890807; AU1989PJ07576 19891124; WO1990AU00337 19900807

Also published as:

 DE69027121 (T3)
 WO9102078 (A1)
 US2008234469 (A1)
 JP2008174559 (A)
 JP2007197458 (A)

more >>

Abstract not available for DE 69027121 (T2)

Abstract of corresponding document: **WO 9102078 (A1)**

The present invention relates to ligands which bind to human tumour necrosis factor alpha (TNF) in a manner such that upon binding of these ligands to TNF the biological activity of TNF is modified. In preferred forms the ligand binds to TNF in a manner such that the induction of endothelial procoagulant activity of the TNF is inhibited; the binding of TNF to receptors on endothelial cells is inhibited; the induction of fibrin deposition in the tumour and tumour regression activities of the TNF are enhanced; and the cytotoxicity and receptor binding activities of the TNF are unaffected or enhanced on tumour cells. The ligand is preferably an antibody, F(ab) fragment, single domain antibody (dABs) single chain antibody or a serum binding protein. It is preferred, however, that the ligand is a monoclonal antibody or F(ab) fragment thereof.

Data supplied from the **esp@cenet** database — Worldwide



(19) **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

(12) **Übersetzung der geänderten
europäischen Patentschrift**
(97) **EP 0 486 526 B 2**
(10) **DE 690 27 121 T 3**

(51) Int. Cl.⁷:
C 07 K 16/18
C 07 K 16/24
A 61 K 47/48

DE 690 27 121 T 3

- | | | |
|------|--|----------------|
| (21) | Deutsches Aktenzeichen: | 690 27 121.2 |
| (86) | PCT-Aktenzeichen: | PCT/AU90/00337 |
| (86) | Europäisches Aktenzeichen: | 90 911 467.0 |
| (87) | PCT-Veröffentlichungs-Nr.: | WO 91/02078 |
| (86) | PCT-Anmeldetag: | 7. 8. 1990 |
| (87) | Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: | 21. 2. 1991 |
| (97) | Erstveröffentlichung durch das EPA: | 27. 5. 1992 |
| (97) | Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: | 22. 5. 1996 |
| (97) | Veröffentlichungstag
des geänderten Patents beim EPA: | 7. 3. 2001 |
| (47) | Veröffentlichungstag im Patentblatt: | 30. 8. 2001 |

- (30) Unionspriorität:
5662/89 07. 08. 1989 AU
7576/89 24. 11. 1989 AU
- (73) Patentinhaber:
Peptech Ltd., Dee Why, New South Wales, AU
- (74) Vertreter:
Uexküll & Stolberg, 22607 Hamburg
- (84) Benannte Vertragsstaaten:
CH, DE, DK, ES, FR, GB, IT, LI, NL, SE

- (72) Erfinder:
RATHJEN, Deborah, Anne, Thornleigh, NSW 2120,
AU; ASTON, Roger, West Pennant Hills, NSW 2120,
AU

(54) **BINDELIGANDE FÜR TUMORNEKROSISFAKTOR**

DE 690 27 121 T 3

Die berichtigte Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 4 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Die vorliegende Erfindung betrifft Liganden, welche an den humanen Tumor-Nekrosis-Faktor α (TNF) derart binden, daß die biologische Aktivität von TNF durch die Bindung modifiziert wird. Der vorliegend dargestellte Typ der Modifikation unterscheidet sich von vorhergehenden Beschreibungen von Antikörpern, die an TNF- α binden und sämtliche Aktivität von TNF- α inhibieren. Die neue Erkenntnis zeigt, wie die unterschiedlichen Aktivitäten von TNF- α selektiv inhibiert oder verstärkt werden können. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung eine Zusammensetzung, die ein Molekül umfaßt, welches an TNF gebunden ist, und Verfahren zur Therapie unter Verwendung von TNF und Molekülen, die gegenüber TNF aktiv sind.

Der Tumor-Nekrosis-Faktor α (TNF) ist ein Produkt von aktivierten Makrophagen, das zuerst im Serum von Versuchstieren beobachtet wurde, die mit Bacillus Calmette-Guerin oder Corynebacterium parvum präsensibilisiert und mit Endotoxin (LPS) provoziert worden waren. Infolge der Verabreichung von TNF wurde bei bestimmten transplantierbaren Tumoren von Mäusen eine hämorrhagische Nekrose beobachtet, während TNF in vitro bei Tumorzelllinien zytolytische oder zytostatische Effekte hervorrief.

Zusätzlich zu seinen den Wirt schützenden Effekten ist TNF als Verursacher pathologischer Veränderungen bei Septikämie, Kachexie und zerebraler Malaria diskutiert worden. Durch passive Immunisierung von Mäusen mit einem polyklonalen Kaninchenserum gegen TNF ist gezeigt worden, daß Mäuse vor den letalen Effekten von LPS-Endotoxin, dem Auslöser des Toxinschocks, geschützt werden, wenn die Verabreichung vor der Infektion erfolgt.

Das für TNF kodierende Gen ist kloniert worden und erlaubt die Untersuchung der Brauchbarkeit dieses Monokins als potentielles Mittel bei der Krebstherapie. Während eine TNF-Infusion bei Krebspatienten in klinischen Studien der Stufe 1 zu einer Tumorrückbildung geführt hat, ist auch über Nebenwirkungen wie Thrombozytopenie, Lymphozytopenie, Hepatoxizität, Beeinträchtigung der Niere und Hypertension berichtet worden. Diese mit der klinischen Verwendung von TNF zusammenhängenden, äußerst signifikanten Nebenwirkungen sind angesichts der vielen bekannten

Wirkungen von TNF, von denen einige in der Tabelle 1 aufgeführt sind, vorhersagbar.

TABELLE 1

5 BIOLOGISCHE AKTIVITÄTEN VON TNF

- GEGEN TUMORE GERICHTET
- GEGEN VIREN GERICHTET
- GEGEN PARASITEN GERICHTET

10

FUNKTION

zytotoxische Wirkung auf Tumorzellen

pyrogene Aktivität

angiogene Aktivität

15 Inhibition der Lipoproteinlipase

Aktivierung von neutrophilen Leukozyten

Osteoklastenaktivierung

Aktivität zur Induktion von endothelialen, Monozyten- und
Tumorzell-Gerinnungsfaktorstufen

20 Induktion von Oberflächenantigenen auf Endothelzellen

Induktion von IL-6

Induktion von c-myc und c-fos

Induktion des EGF-Rezeptors

Induktion von IL-1

25 Induktion der TNF-Synthese

Induktion der GM-CSF-Synthese

erhöhte Prostaglandin- und Kollagenase-Synthese

Induktion des Akutphasenproteins C3

30

Von besonderer Bedeutung ist die Aktivierung der Koagulation, welche als Folge der Aktivierung des Endothels und auch der Monozyten des peripheren Blutes durch TNF auftritt. Eine Verbreitung der intravaskulären Koagulation ist mit einem Toxinschock assoziiert, und viele Krebsformen einschließlich Magen-

35 Darm-Krebs, Pankreas-, Prostata-, Mamma- und Ovarialkarzinome, Lungenkrebs, Melanom, akute Leukämie, Myelom, myeloproliferati-

ves Syndrom und myeloblastische Leukämie. Es ist klar, daß solche Modifikationen der TNF-Aktivität, durch die die Aktivität zur Tumorrückbildung intakt bleibt, andere unerwünschte Wirkungen wie die Aktivierung der Koagulation aber beseitigt oder maskiert werden, zu einer vorteilhafteren Krebstherapie führen würden, während eine vollständige Aufhebung der TNF-Aktivität zur erfolgreichen Behandlung eines Toxinschocks vorgeschlagen wird.

Die Segregation der hormonalen Aktivität durch die Verwendung von ortsspezifischen Antikörpern (sowohl polyklonal als auch monoklonal) kann zu einer verstärkten hormonalen Aktivität führen (Aston et al., 1989, Mol. Immunol. 26, 435). Bis heute sind wenige Versuche unternommen worden, die Antigenität oder Funktion bestimmten Regionen des TNF-Moleküls zuzuordnen, dessen dreidimensionale Struktur nunmehr bekannt ist. Durch Zuordnung der Funktion zu solchen Regionen würde die Entwicklung von MAKs und anderen Liganden für therapeutische Zwecke ermöglicht werden. Es ist berichtet worden, daß polyklonale Antikörper gegen die Aminosäuren 1 bis 15 die Bindung des Hela R19-Zellrezeptors durch TNF blockieren (Socher et al., 1987, PNAS 84, 8829), während bei monoklonalen Antikörpern, die undefinierte konformationelle Epitope des TNF erkennen, gezeigt worden ist, daß sie die TNF-Zytotoxizität in vitro inhibieren (Bringman und Aggarwal, 1987, Hybridoma 6, 489). Die Effekte dieser Antikörper auf andere TNF-Aktivitäten sind jedoch unbekannt.

Die EP-A-0 288 088 beschreibt eine begrenzte Anzahl von monoklonalen Antikörpern, von denen gesagt wird, daß sie an bestimmte Epitope des humanen TNF binden. Diese Epitope sind in den Aminosäuren 68 bis 97, 7 bis 37 und 113 bis 127 des humanen TNF enthalten.

EP-A-0 260 610 offenbart monoklonale Antikörper, die an humanes TNF binden, einschließlich AM-195, der durch die Zelllinie ECACC 87050801 sekretiert wird, der die zytotoxische Aktivität von humanem TNF neutralisiert.

Die Erfinder der vorliegenden Anmeldung haben eine Reihe von monoklonalen Antikörpern, die gegenüber dem humanen TNF

aktiv sind, hergestellt, und sie haben sie im Hinblick auf ihre Wirkungen auf den Antitumoreffekt von TNF (sowohl *in vitro* als auch *in vivo*), auf die TNF-Rezeptorbindung, die Aktivierung der Koagulation (sowohl *in vitro* als auch *in vivo*) charakterisiert und deren topographische Spezifitäten definiert. Durch diesen Ansatz konnte gezeigt werden, daß unterschiedliche topographische Regionen von TNF- α mit unterschiedlichen Aktivitäten assoziiert sind. Demgemäß ermöglicht die vorliegende Erfindung die Identifizierung von Antikörpern oder Liganden, welche die Aktivität von TNF- α selektiv verstärken oder inhibieren, wodurch verbesserte therapeutische Mittel und Therapiepläne bereitgestellt werden, die TNF- α einschließen.

Nach einer ersten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird ein Antikörper oder ein Antikörperfragment bereitgestellt mit der Fähigkeit zur Bindung an TNF, wobei der Antikörper oder das Antikörperfragment dadurch gekennzeichnet ist, daß, wenn er bzw. es an TNF bindet, die Aktivität des TNF zur Induktion von endothelialen Gerinnungsfaktorvorstufen inhibiert wird, wobei der Antikörper oder das Antikörperfragment derart an den TNF bindet, daß das Epitop des TNF, definiert durch die topographische Region von 1-18, 58-65, 115-125 und 138-149, oder die topographische Region der Reste 1-18 und 108-128, oder die topographische Region der Reste 56-79, 110-127 und 135-155, oder die topographische Region der Reste 1-30, 117-128 und 141-153, oder die topographische Region der Reste 1-18, oder die topographische Region der Reste 22-40, 49-97, 110-127 und 136-153, oder die topographische Region der Reste 1-20 und 76-90, oder die topographische Region der Reste 22-40, 69-97, 105-128 und 135-155, im wesentlichen an der Bindung an natürlich vorkommende, biologisch aktive Liganden gehindert wird.

Nach einer zweiten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird ein Antikörper oder ein Antikörperfragment bereitgestellt mit der Fähigkeit, derart an den humanen TNF zu binden, daß, wenn er bzw. es an TNF bindet, die Aktivität des TNF zur Tumor-Fibrinablagerung verstärkt wird, die Aktivität des TNF zur Induktion von endothelialen Gerinnungsfaktorvorstufen nicht

beeinflusst wird, und die Aktivitäten des TNF zur Zytotoxizität, zur Tumorrückbildung und zur Rezeptorbindung inhibiert werden, dadurch gekennzeichnet, daß, wenn der Antikörper oder das Antikörperfragment an den TNF bindet, das Epitop des TNF, definiert durch die topographischen Regionen der Reste 12-22, 36-45, 96-105 und 132-157, im wesentlichen an der Bindung an natürlich vorkommende, biologisch aktive Liganden gehindert wird, und/oder daß der Antikörper oder das Antikörperfragment an den humanen TNF in den topographischen Regionen der Reste 12-22, 36-45, 96-105 und 132-157 bindet.

Nach einer dritten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird ein Antikörper oder ein Antikörperfragment bereitgestellt mit der Fähigkeit, derart an den humanen TNF zu binden, daß die Aktivitäten des TNF zur Tumor-Fibrinablagerung, zur Induktion von endothelialen Gerinnungsfaktorvorstufen, zur Zytotoxizität, zur Tumorrückbildung und zur Rezeptorbindung nicht beeinflusst werden, dadurch gekennzeichnet, daß, wenn der Antikörper oder das Antikörperfragment an den TNF bindet, das Epitop des TNF, definiert durch die topographischen Regionen der Reste 22-31 und 146-157, im wesentlichen an der Bindung an natürlich vorkommende, biologisch aktive Liganden gehindert wird, und/oder daß der Antikörper oder das Antikörperfragment an den humanen TNF in den topographischen Regionen der Reste 22-31 und 146-157 bindet.

Nach einer vierten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird ein Antikörper bereitgestellt mit der Fähigkeit, derart an den humanen TNF zu binden, daß die Aktivität des TNF zur Induktion von endothelialen Gerinnungsfaktorvorstufen nicht beeinflusst wird, und die Aktivitäten des TNF zur Zytotoxizität, zur Tumorrückbildung, zur Tumor-Fibrinablagerung und zur Rezeptorbindung inhibiert werden, dadurch gekennzeichnet, daß, wenn der Antikörper oder das Antikörperfragment an den TNF bindet, das Epitop des TNF, definiert durch die topographischen Regionen der Reste 22-40 und entweder 49-98 oder 70-87, im wesentlichen an der Bindung an natürlich vorkommende, biologisch aktive Liganden gehindert wird, und/oder daß der Antikörper oder das

Antikörperfragment an den humanen TNF in der topographischen Region der Reste 22-40 und entweder 49-98 oder 70-87 bindet, wobei der Antikörper nicht der Antikörper AM-195 ist, der durch die Zelllinie ECACC 87050801 sekretiert wird.

5 Bevorzugte Aspekte der vorliegenden Erfindung sind in den abhängigen Ansprüchen angegeben.

Der Antikörper oder das Antikörperfragment kann ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus F(ab)-Fragmenten, restrukturierten Antikörpern (CDR-transplantierte, humanisierte Antikörper), Einzeldomänen-Antikörpern (dAKs) und einzelkettigen Antikörpern. Es ist jedoch derzeit bevorzugt, daß der Antikörper oder das Antikörperfragment ein monoklonaler Antikörper oder ein F(ab)-Fragment davon ist.

15 Die vorliegende Erfindung schließt besondere monoklonale Antikörper oder Fragmente davon ein. Diese Antikörper werden nachfolgend aufgeführt:

A) Ein monoklonaler Antikörper, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den monoklonalen Antikörpern mit den Bezeichnungen MAb 1, MAb 47 und MAb 54 (vgl. Anspruch 3). Proben der Hybridom-Zelllinien, welche MAb 1, MAb 54 und MAb 47 produzieren, sind bei der European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC), Vaccine Research and Production Laboratory, Public Health Laboratory Service, Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, Vereinigtes Königreich, hinterlegt worden. Der MAb 1 wurde am 3. August 1989 hinterlegt und hat die Zugriffsnummer 89080301 erhalten. Der MAb 54 wurde am 31. August 1989 hinterlegt und hat die Zugriffsnummer 89083103 erhalten. Der MAb 47 wurde am 14. Dezember 1989 hinterlegt und hat die Zugriffsnummer 89121402 erhalten.

30 B) Der monoklonale Antikörper mit der Bezeichnung MAb 42 (vgl. Anspruch 10). Eine Probe der den MAb 42 produzierenden Hybridom-Zelllinie wurde bei der European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC), Vaccine Research and Production Laboratory, Public Health Laboratory Service, Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, Salis-

bury, Wiltshire SP4 OJG, Vereinigtes Königreich, am 3. August 1989 hinterlegt und hat die Zugriffsnummer 89080304 erhalten.

5 C) Der monoklonale Antikörper mit der Bezeichnung MAb 25 (vgl. Anspruch 21). Eine Probe der den MAb 25 produzierenden Hybridom-Zelllinie wurde bei der European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC), Vaccine Research and Production Laboratory, Public Health Laboratory Service, Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 OJG, Vereinigtes Königreich, am 14. Dezember 1989 hinterlegt und hat die Zugriffsnummer 89121401 erhalten.

10 D) Der monoklonale Antikörper mit der Bezeichnung MAb 21 (vgl. Anspruch 17). Eine Probe der den MAb 21 produzierenden Hybridom-Zelllinie wurde bei der European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC), Vaccine Research and Production Laboratory, Public Health Laboratory Service, Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 OJG, Vereinigtes Königreich, am 25. Januar 1990 hinterlegt und hat die Zugriffsnummer 90012432 erhalten.

15 E) Der monoklonale Antikörper mit der Bezeichnung MAb 53 (vgl. Anspruch 19). Eine Probe der den MAb 53 produzierenden Hybridom-Zelllinie wurde bei der European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC), Vaccine Research and Production Laboratory, Public Health Laboratory Service, Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 OJG, Vereinigtes Königreich, am 25. Januar 1990 hinterlegt und hat die Zugriffsnummer 90012433 erhalten.

25 F) Der monoklonale Antikörper mit der Bezeichnung MAb 37 (vgl. Anspruch 23). Eine Probe der den MAb 37 produzierenden Hybridom-Zelllinie wurde bei der European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC), Vaccine Research and Production Laboratory, Public Health Laboratory Service, Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 OJG, Vereinigtes Königreich, am 25. Januar 1990 hinterlegt und hat die Zugriffsnummer 90012434 erhalten.

bury, Wiltshire SP4 0JG, Vereinigtes Königreich, am 3. August 1989 hinterlegt und hat die Zugriffsnummer 89080303 erhalten.

5 Die biologischen Aktivitäten des TNF, auf die vorliegend durch die Begriffe "Tumorrückbildung", "Induktion von endothelialen Gerinnungsfaktorvorstufen", "Induktion der Tumor-Fibrinablagerung", "Zytotoxizität" und "Rezeptorbindung" Bezug genommen wird, sind nach den nachfolgend beschriebenen Verfahren zu
10 bestimmen.

Der vorliegend verwendete Begriff "Einzeldomänen-Antikörper" wird zur Bezeichnung solcher Antikörperfragmente verwendet, wie sie von Ward et al. beschrieben und von diesen Autoren vorgeschlagen worden sind (Nature, 341, 544-546 (1989)).

15 Um das Wesen der vorliegenden Erfindung besser verständlich zu machen, werden nachfolgend bevorzugte Formen derselben unter Bezugnahme auf die folgenden Beispiele und begleitenden Figuren beschrieben.

20 Fig. 1 zeigt die Ergebnisse eines Titrationsassays mit MAb 1 gegen TNF.

Fig. 2 zeigt einen TNF/MAb 1-Scatchard-Plot und eine Affinitätsbestimmung.

25 Fig. 3 zeigt den Effekt der monoklonalen Anti-TNF-Antikörper 1 und 32 auf die TNF-Zytotoxizität bei WEHI-164-Zellen.

Fig. 4 zeigt den Effekt von MAb 1 auf TNF-induzierte Rückbildung eines soliden Meth A-Tumors.

Fig. 5 zeigt den Effekt der MAbs 1 und 25 auf die TNF-induzierte Meth A Aszites-Tumorrückbildung.

30 Fig. 6 zeigt den Effekt von Anti-TNF-MAbs auf die Aktivität des TNF zur Induktion von endothelialen Gerinnungsfaktorvorstufen.

Fig. 7 zeigt den Einbau von markiertem Fibrinogen in Tumoren von Tumore aufweisenden Mäusen und den Effekt von Anti-TNF-
35 MAbs.

Fig. 8 ist eine schematische Darstellung von Epitopen des TNF.

Fig. 9 zeigt den Effekt von Anti-TNF-MAbs auf die TNF-induzierte Rückbildung von WEHI-164-Tumoren.

5 Fig. 10 zeigt die Verstärkung der TNF-Rückbildungsaktivität durch MAb 32 in zwei Experimenten.

Fig. 11 zeigt die Verstärkung der TNF-induzierten Tumorrückbildung durch MAb 32 - Dosiswirkung am Tag 1 und Tag 2.

10 Fig. 12 zeigt die Bindung von radioaktiv markiertem TNF an Rezeptoren auf bovinen Aorta-Endothelzellen.

Fig. 13 zeigt Untersuchungen zur Rezeptorbindung von TNF, komplexiert mit MAb 32 (-♦-), Kontrollantikörper (-□-) und MAb 47 (-■-) mit der Melanomzelllinie MM418E.

15 Fig. 14 zeigt Untersuchungen zur Rezeptorbindung von TNF, komplexiert mit MAb 32 (-♦-), Kontrollantikörper (-□-) und MAb 47 (-■-) mit der Melanomzelllinie IGR3.

Fig. 15 zeigt Untersuchungen zur Rezeptorbindung von TNF, komplexiert mit MAb 32 (-♦-), Kontrollantikörper (-□-) und MAb 47 (-■-) mit der Blasenkarzinom-Zelllinie 5637.

20 Fig. 16 zeigt Untersuchungen zur Rezeptorbindung von TNF, komplexiert mit MAb 32 (-♦-), Kontrollantikörper (-□-) und MAb 47 (-■-) mit der Mammakarzinom-Zelllinie MCF7.

Fig. 17 zeigt Untersuchungen zur Rezeptorbindung von TNF, komplexiert mit MAb 32 (-♦-), Kontrollantikörper (-□-) und 25 MAb 47 (-■-) mit der Colonkarzinom-Zelllinie B10.

Fig. 18 zeigt den Effekt der TNF-vermittelten Tumorrückbildung in vivo durch MAb 32 (■), Kontroll-MAb (□) und MAB 47 (*).

Fig. 19 zeigt den Effekt der TNF-vermittelten Tumorrückbildung in vivo durch Kontroll-MAb, MAb 32 und univalente Fab'-Fragmente von MAb 32.

Fig. 20 zeigt den Effekt auf die TNF-induzierte Tumorrückbildung durch Kontroll-MAb (■), MAb 32 (□) und Peptid 301-Antiserum (□).

35 Fig. 21 zeigt die Reaktivität von MAb 32 mit überlappenden Peptiden mit einer Länge von 10 Aminosäuren.

Fig. 22 zeigt eine schematische, dreidimensionale Darstellung des TNF-Moleküls.

Fig. 23 zeigt topographisch die Region der Reste 1-20, 56-77, 108-127 und 138-149.

5 Fig. 24 zeigt topographisch die Region der Reste 1-18 und 108-128.

Fig. 25 zeigt topographisch die Region der Reste 56-79, 110-127 und 136-155.

10 Fig. 26 zeigt topographisch die Region der Reste 1-26, 117-128 und 141-153.

Fig. 27 zeigt topographisch die Region der Reste 22-40, 49-97, 110-127 und 136-153.

Fig. 28 zeigt topographisch die Region der Reste 12-22, 36-45, 96-105 und 132-157.

15 Fig. 29 zeigt topographisch die Region der Reste 1-20 und 76-90.

Fig. 30 zeigt topographisch die Region der Reste 22-40, 69-97, 105-128 und 135-155.

20 Fig. 31 zeigt topographisch die Region der Reste 22-31 und 146-157.

Fig. 32 zeigt topographisch die Region der Reste 49-98.

Fig. 33 zeigt topographisch die Region der Reste 22-40 und 70-87.

25 Tiere und Tumorzelllinien

In sämtlichen Experimenten wurden weibliche BALB/C-Mäuse im Alter von 10-12 Wochen eingesetzt, welche von der CSIRO-Tiereinrichtung erhalten worden waren. Ein solider Meth A-Tumor und Meth A-Aszites-Tumorzelllinien wurden aus dem Labor von Dr. Lloyd J. Old (Sloan Kettering Cancer Centre) erhalten, und die Fibrosarcomlinie WEHI-164 wurde erhalten von Dr. Geeta Chauhdri (John Curtin School of Medical Research, Australian National University).

35 Fusionen und Produktion von Hybridomzellen

Mäuse wurden durch intraperitoneale Verabreichung von 10 µg humanem rekombinanten TNF in Freund's vollständigem Adjuvans immunisiert. Einen Monat später wurden 10 µg TNF in Freund's unvollständigem Adjuvans verabreicht. 6 Wochen später und 4 Tage
5 vor der Fusion erhielten ausgewählte Mäuse eine Booster-Injektion mit 10 µg TNF in PBS. Die Milzzellen von immunen Mäusen wurden mit dem Myelom Sp2/0 nach dem Verfahren von Rathjen und Underwood fusioniert (1986, Mol. Immunol. 23, 441). Die Zelllinien, bei denen man durch Radioimmunoassay nachweisen konnte,
10 daß sie Anti-TNF-Antikörper sezernieren, wurden durch Grenzverdünnung in einer Nährschicht von peritonealen Makrophagen der Maus subkloniert. Die Bestimmung von Antikörper-Unterklassen erfolgte durch ELISA (Misotest, Commonwealth Serum Laboratories).

15

Radioimmunoassay

Der TNF wurde unter Verwendung von Lactoperoxidase nach Standardverfahren mit Iod radioaktiv markiert. Die Kulturüberstände von Hybridomzellen (50 µl) wurden über Nacht bei 4 °C mit
20 ¹²⁵I-TNF (20 000 cpm in 50 µl) inkubiert, bevor 100 µl Sac-Cel (Cellulose, beschichtet mit Anti-Maus/Ratte-Immunglobulinen eines Esels, Wellcome Diagnostics) zugegeben wurden und für weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur (20 °C) inkubiert wurde. Nach dieser Inkubation wurde 1 ml PBS zugegeben, und die Röhrchen wurden 5 Minuten lang bei 2500 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, und der Niederschlag wurde auf gebundene Radioaktivität untersucht.

25

Antikörper/Antikörper-Kompetitionsassays

Die vergleichenden Spezifitäten der monoklonalen Antikörper wurden in Kompetitionsassays untersucht, bei denen entweder immobilisiertes Antigen (LACT) oder Antikörper (PACT) eingesetzt wurden (Aston und Ivanyi, 1985, Pharmac. Therapeut. 27, 403).

35 PACT

Flexible Mikrotiterplatten wurden über Nacht bei 4 °C mit monoklonalem Antikörper (mit Natriumsulfat präzipitierte Globuline aus der Aszitesflüssigkeit der Maus, 100 µg/ml in Natriumbicarbonat-Puffer, 0,05 M, pH-Wert 9,6) beschichtet, bevor die unspezifischen Bindungsstellen mit 1 % bovinem Serumalbumin in PBS (BSA/PBS) blockiert wurden. Die Bindung von ¹²⁵I-TNF an immobilisierte Antikörper wurde in Gegenwart von variierenden Konzentrationen eines zweiten monoklonalen Anti-TNF-Antikörpers bestimmt. Der Antikörper und der TNF wurden gleichzeitig zugegeben und 24 Stunden lang inkubiert, bevor mit PBS (4mal) gewaschen wurde und die Vertiefungen hinsichtlich der gebundenen Radioaktivität ausgewertet wurden. In Abwesenheit von heterologen monoklonalen Antikörpern wurde eine 100%ige Bindung festgestellt, während bei Anwesenheit eines Überschusses an homologem monoklonalen Antikörper eine 100%ige Konkurrenz beobachtet wurde. Sämtliche Verdünnungen erfolgten mit BSA/PBS.

LACT

Die Bindung von Protein A-gereinigten, radioaktiv markierten, monoklonalen Antikörpern an mit TNF beschichtete Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurde in Gegenwart variierender Konzentrationen eines zweiten monoklonalen Antikörpers bestimmt. Die Mikrotiterplatten wurden mit TNF (50 µg/ml) wie oben beschrieben beschichtet. Die Mengen an kompetierenden Antikörpern (50 µl) wurden 4 Stunden lang bei 4 °C auf Platten präinkubiert, bevor mit ¹²⁵I markierte monoklonale Antikörper (30 000 cpm) für weitere 24 Stunden zugegeben wurden. Nach 4maligem Waschen mit PBS erfolgte die Auswertung der an die Vertiefungen gebundenen radioaktiven Produkte. Bei Abwesenheit des kompetierenden Antikörpers wurde eine 100%ige Bindung festgestellt, während in Gegenwart eines Überschusses an unmarkiertem monoklonalen Antikörper eine 100%ige Konkurrenz festgestellt wurde.

WEHI-164 Zytotoxizitätsassay

Ein Bioassay über die Aktivität von rekombinantem TNF erfolgte nach Espevik und Nissen-Meyer (1986, J. Immunol. Methods

95, 99). Der Effekt des monoklonalen Antikörpers auf die TNF-Aktivität wurde ermittelt durch Zugabe des monoklonalen Antikörpers zu Zellkulturen von ABT90.

5 Experimente zur Tumorrückbildung

Die Veränderung der TNF-induzierten Aktivität zur Tumorrückbildung durch monoklonale Antikörper wurde anhand von drei Tumormodellen ermittelt: die subkutanen Tumore WEHI-164 und Meth A-Sarcom und der Aszites-Meth A-Tumor. Die subkutanen Tumore wurden durch Injektion von ungefähr 5×10^5 Zellen induziert. Hierdurch wurden etwa 14 Tage später Tumore von 10 bis 15 mm gebildet. Die Mäuse erhielten an vier aufeinanderfolgenden Tagen eine intraperitoneale Injektion mit humanem rekombinanten TNF (10 µg) plus monoklonalem Antikörper (200 µl Aszites-Globulin). Die Kontrollgruppen erhielten Injektionen von PBS allein oder von TNF plus monoklonalem Antikörper gegen bovines Wachstums-hormon. Zu Beginn eines jeden Experiments wurde die Tumorgroße im Falle solider Tumore mit einem Greifzirkel oder im Falle von Aszites-Mäusen durch Wiegen der Tumor-aufweisenden Tiere gemessen. Diese Messungen erfolgten täglich über die gesamte Dauer des Experiments.

Radiorezeptorassays

Bis zur Konfluenz kultivierte WEHI-164-Zellen wurden durch Abschaben geerntet und einmal mit 1 % BSA in Hank's balancierter Salzlösung (HBSS, Gibco) gewaschen. 100 µl unmarkierter TNF (1-10 000 ng/Röhrchen) oder monoklonaler Antikörper (10fache Verdünnungen, beginnend mit 1 in 10 bis 1 in 100 000 Aszites-Globulin) wurden 50 µl ^{125}I -TNF (50 000 cpm) zugegeben. Die WEHI-Zellen wurden anschließend zugegeben (200 µl, enthaltend 2×10^6 Zellen). Diese Mischung wurde in einem geschüttelten Wasserbad 3 Stunden lang bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf dieser Inkubation wurde 1 ml HBSS zugegeben, und die Zellen wurden 30 Sekunden lang bei 16 000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und im Zelniederschlag gebundener ^{125}I -TNF wurde ge-

zählt. Sämtliche Verdünnungen erfolgten in 1 % BSA enthaltender HBSS.

Induktion endothelialer Zellen zur Bildung von Gerinnungsfaktor-
5 vorstufen durch TNF

Bovine Endothelzellen der Aorta (Passage 10) wurden bei 37 °C in 5 % CO₂ in RPMI-1640 kultiviert, welches 10 % fötales Kälberserum (FCS), Penicillin, Streptomycin und 2-Mercaptoethanol enthielt. Zur Induktion der Aktivität zur Bildung von Gerinnungsfaktorvorstufen durch TNF wurden die Zellen mit Trypsin
10 behandelt und nach dem Protokoll von Bevilacqua *et al.*, 1986 (PNAS 83, 4533) auf Costar-Platten mit 24 Vertiefungen ausgeplattiert. TNF (0-500 Einheiten/Kultur) und monoklonaler Antikörper (Verdünnung von 1 : 250 von Aszites-Globulin) wurden nach
15 dem Waschen der konfluenten Einzellschicht mit HBSS zugegeben. Die Zellen wurden nach 4 Stunden durch Abschaben geerntet, eingefroren und mit Ultraschall behandelt. Die gesamte zelluläre Aktivität zur Bildung von Gerinnungsfaktorvorstufen wurde ermittelt durch die Recalcifikationszeit von normalem Spenderplasma mit geringer Plättchenzahl bei 37 °C, wobei 100 µl mit Citrat
20 behandeltes Plasma mit geringem Plättchenanteil 100 µl Zelllysate und 100 µl Calciumchlorid (30 mM) zugegeben und die zur Klumpchenbildung erforderliche Zeit aufgezeichnet wurden. In einigen Experimenten erfolgte die Zugabe des Tumorzellkulturüberstandes
25 zu Endothelzellen, die mit TNF und/oder monoklonalem Antikörper (Endkonzentration 1 : 2) behandelt worden waren.

Einbau von ¹²⁵I-Fibrinogen in Tumore von Mäusen, die mit TNF und monoklonalem Antikörper behandelt wurden

30 Um den Effekt von TNF und von monoklonalen Antikörpern auf die Fibrinbildung *in vivo* zu untersuchen, erhielten BALB/C-Mäuse subkutane Injektionen mit WEHI-164-Zellen (10⁵ Zellen/Tier). Nach 7-14 Tagen, wenn die Tumore einen Durchmesser von ungefähr 1 cm erreicht hatten, erhielten die Tiere eine intraperitoneale Injektion mit TNF (10 µg/Tier) und mit ¹²⁵I-markiertem humanen
35 Fibrinogen (7,5 µg/Tier, 122 µCi/mg, Amersham) entweder allein

oder in Gegenwart von monoklonalen Antikörpern gegen den humanen TNF (200 µl/Tier Aszites-Globulin). Der monoklonale Antikörper gegen bovines Wachstumshormon wurde als monoklonaler Kontroll-Antikörper eingesetzt. Zwei Stunden nach der TNF-Infusion wurde
5 der Einbau von ¹²⁵I-markiertem Fibrinogen in das Mausegewebe ermittelt, indem ein Stück des Gewebes entfernt, gewogen und zum Zählen der radioaktiven Zerfälle in ein γ-Zählgerät überführt wurde.

Insgesamt wurden 13 monoklonale Antikörper isoliert, die
10 mit humanem TNF reagieren. Diese monoklonalen Antikörper wurden bezeichnet mit MAb 1, MAb 11, MAb 12, MAb 20, MAb 21, MAb 25, MAb 31, MAb 32, MAb 37, MAb 42, MAb 47, MAb 53 und MAb 54. Der Effekt dieser monoklonalen Antikörper auf die biologische Aktivität von humanem TNF ist in Tabelle 2 dargelegt.

15 Aus Tabelle 2 ist ersichtlich, daß, obgleich einige monoklonale Antikörper sowohl die Anti-Tumor-Aktivität als auch die Aktivierung der Koagulation durch humanen TNF inhibieren (MAb 1, 47 und 54), nicht alle Antikörper, die die Anti-Tumor-Aktivität inhibieren, die Aktivierung der Koagulation entweder in vitro
20 oder in vivo inhibieren (MAb 11, 12, 25 und 53). In der Tat verstärkte der MAb 21, welcher die Tumorrückbildung inhibierte, die Aktivierung der Koagulation in vivo.

TABELLE 2

EFFEKT DER MONOKLONALEN ANTIKÖRPER AUF DIE TNF-BIOAKTIVITÄT

5		<u>MONOKLONALER ANTIKÖRPER</u>													
	TNF- BIOAKTIVITÄT	1	11	12	20	21	25	31	32	37	42	47	53	54	
	Zytotoxizität	-	-	-	0	-	-	0	0	0	0	-	-	-	
	Tumorrückbildung	-	-	-	0	-	-	0	+	0	0	-	-	-	
10	Induktion v. (endo- thelialen) Gerinnungs- faktor- vorstufen	-	0	0	-	-	0	0	-	0	-	-	-	-	
15	Fibrinablagerung (Tumor)	-	-	-	+	+	+	-	+	0	-	-	0	-	
	Rezeptorbindung (WEHI-164)	-	-	-	0	-	-	0	+ / 0*	0	0	-	-	-	

+ Verstärkung

20 0 Kein Effekt

- Inhibition

* Abhängig von der Mab-Konzentration im Falle von WEHI-164-Tumorzellen und vom Tumortyp (vgl. Fig. 3, 13-17).

25

Die MAb's 1, 47 und 54, von denen in Kompletions-Bindungsstudien gezeigt worden ist, daß sie ein Epitop von TNF gemeinsam teilen, weisen in hohem Maße erwünschte Eigenschaften bei der Behandlung eines Toxinschocks und anderen Zuständen einer bakteriellen, viralen und parasitären Infektion auf, bei denen die TNF-Spiegel hoch sind und eine vollständige Neutralisierung von TNF erfordern. Andere monoklonale Antikörper wie der Mab 32 sind eher als Mittel zur gemeinsamen Verabreichung mit TNF im Rahmen einer Krebstherapie angemessen, da sie die Tumorrückbildung nicht inhibieren, die Aktivierung der Koagulation jedoch inhibieren. Diese Form der Therapie ist besonders angezeigt in Verbindung mit zytotoxischen Arzneimitteln, die bei der Krebstherapie verwendet werden, welche die Aktivierung der Koagulation durch TNF potentieren können (z.B. Vinblastin, Azyklovir, INF- α , IL-2, Dactinomycin, AZT, Radiotherapie, Adriamycin, Mytomycin C, Zytosinarabinosid, Daunorubicin, Cisplatin, Vincristin, 5-Fluo-

rouracil, Bleomycin (N. Watanabe et al., 1988, Immunopharmacol. Immunotoxicol. 10, 117-127), oder bei Erkrankungen, bei denen die TNF-Werte in bestimmten Stadien niedrig sind (z.B. AIDS) und bei denen Individuen mit AIDS zusammenhängende Krebsformen auf-
5 weisen können, wie z.B. Kaposi-sarcom, Non-Hodgkins-Lymphom und Karzinom des schuppenförmigen Typs.

Der monoklonale Antikörper MAb 1 verfügt über die folgenden Eigenschaften:

- 10 1. Er bindet den humanen rekombinanten TNF- α , nicht aber humanes Lymphotoxin (TNF- β) oder humanes Interferon. Ferner kreuzreagiert der MAb 1 nicht mit rekombinatem murinen TNF (Fig. 1).
2. Der MAb 1 gehört zum Immunglobulintyp IgG1, K mit einer
15 geschätzten Affinität von $4,4 \times 10^{-9}$ Mol/Liter (Fig. 2).
3. Der MAb neutralisiert den zytotoxischen Effekt von rekombinatem humanen TNF gegenüber kultivierten WEHI-164-Fibrosarcomzellen der Maus. 1 μ g des MAb 1 neutralisiert ungefähr 156,25 Einheiten von TNF in vitro (Fig. 3).
- 20 4. Der MAb 1 neutralisiert die Aktivität des TNF zur Tumorrückbildung bei den folgenden Maus-Tumormodellen in vivo: subkutaner, solider WEHI-164-Tumor, subkutaner, solider Meth A-Tumor und Meth A-Aszites-Tumor (Fig. 4, 5 und 9).
5. Der MAb 1 verhindert in Mäusen, die mit Malariaparasiten
25 infiziert sind, eine durch den humanen TNF verursachte Schädigung des Nervensystems.
6. In Radiorezeptorassays verhindert MAb 1 die Bindung von TNF an Rezeptoren auf WEHI-164-Zellen (Tabelle 3).
7. Der MAb 1 inhibiert die Induktion der prokoagulierenden
30 Aktivität (Gewebefaktor) von kultivierten, bovinen Aorta-Endothelzellen (Fig. 6).
8. Der MAb 1 reduziert die Aufnahme von 125 I-Fibrinogen in Tumoren von Mäusen, die mit TNF behandelt wurden (Fig. 7).
9. Der MAb 1 kompetiert hinsichtlich der Bindung von 125 I-TNF
35 und teilt sich demgemäß ein überlappendes Epitop mit den

folgenden monoklonalen Antikörpern: 21, 25, 32, 47, 54 und 37.

10. Der MAb 1 kompetiert nicht hinsichtlich der Bindung von ^{125}I -TNF mit den folgenden monoklonalen Antikörpern: 11, 12, 42, 53, 31 und 20 (Fig. 8).

TABELLE 3

RADIOREZEPTORASSAY: INHIBITION DER TNF-BINDUNG AN WEHI-164-ZELLEN DURCH MAb 1

BEHANDLUNG		% SPEZIFISCHE BINDUNG
15	MAb 1 1/10	0
	1/100	21
	1/1000	49
	1/10 000	73
	1/100 000	105
20	kalter TNF (ng/Röhrchen)	
	10 000	0
	5000	0
	1000	0
	500	10
	100	11
25	10	64
	1	108
	0	100

Der MAb 32 ist ein IgG2b,K-Antikörper mit einer Affinität für den humanen TNF- α von $8,77 \times 10^{-9}$ Mol/Liter, wie durch Scatchard-Analyse ermittelt wurde. Dieser monoklonale Antikörper reagiert weder mit dem humanen TNF- β (Lymphotoxin) noch mit dem TNF- α der Maus.

Wie in Figur 3 dargestellt ist, inhibiert der MAb 32 nicht die TNF-Zytotoxizität in vitro, wie in dem WEHI-164-Assay ermittelt wurde.

Der monoklonale Antikörper 32 verstärkt die TNF-Aktivität zur Induktion der Tumorrückbildung gegenüber WEHI-164-Fibrosarcomtumoren, die BALB/c-Mäusen subkutan implantiert wurden, bei einer TNF-Dosis von 10 $\mu\text{g}/\text{Tag}$ (vgl. Fig. 10 und 11). Dieses Merkmal ist nicht allen monoklonalen Antikörpern gemeinsam, die

gegen den TNF gerichtet sind (Fig. 9), ergibt sich aber aus der Spezifität des MAb 32 für die Bindungsstelle (Fig. 8), wodurch eine größere, von dem Rezeptor vermittelte Aufnahme von TNF in Tumorzellen ermöglicht wird (s. Tabelle 4).

5

TABELLE 4
BINDUNG VON TNF AN REZEPTOREN AUF WEHI-164-ZELLEN IN GEGENWART VON MAb 32

10

% BINDUNG ^{125}I -TNF

15

MAB-VERDÜNNUNG	KONTROLL-MAB	MAB 32
1/10	36	141
1/100	74	88
1/1000	101	83
1/10 000	92	82
1/100 000	97	93

20

25

30

Die Steigerung der TNF-Aktivität durch den MAb 32 bei niedrigeren TNF-Dosierungen ist derart, daß mindestens 10mal weniger TNF erforderlich ist, um dasselbe Ausmaß an Tumorrückbildung zu erzielen (s. Fig. 11 und 18). Die Ergebnisse für Tag 1, 2,5 µg und 1 µg TNF, und für Tag 2, 5 µg, 2,5 µg und 1 µg, erweisen sich in einem T-Test mit $p < 0,01$ als statistisch signifikant. Diese Steigerungsrate erhöht auch die Überlebensrate von Rezipienten, da die verwendete niedrigere Dosis an TNF nicht toxisch ist. Die Fig. 19 zeigt, daß univalente Fab-Fragmente des MAb 32 ebenfalls und in derselben Weise wie der gesamte MAb 32 eine Verstärkung der TNF-induzierten Tumorrückbildung verursachen (siehe unten).

35

Der MAb 32 inhibiert die Expression von Gerinnungsfaktoren auf Endothelzellen, die normalerweise durch Inkubation der kultivierten Zellen mit TNF induziert werden (s. Fig. 6). Dieses Ansprechen kann durch einen zuvor nicht identifizierten TNF-Rezeptor vermittelt sein, der von dem auf anderen Zellen gefundenen Rezeptor verschieden ist.

Umgekehrt verstärkt der MAb 32 die in vivo-Aktivierung der Koagulation innerhalb des Tumorbettes, wie durch den Einbau von

radioaktiv markiertem Fibrinogen gezeigt wird (Fig. 7). Dies kann auf die Aktivierung von Gerinnungsfaktorstufen von Monozyten/Makrophagen zurückzuführen sein und kann zur weiteren Aufklärung des Mechanismus der TNF-induzierten Tumorrückbildung beitragen.

Die mit dem MAb 32 erhaltenen Ergebnisse sind im Vergleich zu anderen Anti-TNF-MAbs in Tabelle 2 dargestellt.

Die Fähigkeit von MAb 32 und MAb 47 zur Inhibition der Bindung von TNF an Endothelzellen wurde ebenfalls ermittelt. Bovine Aorta-Endothel (BAE)-Zellen (Passage 11) wurden auf Kulturschalen mit 24 Vertiefungen (Corning) ausplattiert, welche zuvor mit Gelatine (0,2 %) beschichtet worden waren, und die Zellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert in McCoys 5A (modifiziertem)-Medium, ergänzt mit 20 % fötalem Kälberserum. Für den Radiorezeptorassay wurden sämtliche Verdünnungen (von kaltem TNF und MAb) in diesem Medium durchgeführt. Die BAE-Zellen wurden 1 Stunde lang in Anwesenheit von entweder kaltem TNF (0 bis 100 ng) oder MAb (Aszites-Globuline, verdünnt 1/100 bis 1/100 000) und iodiertem TNF inkubiert (50 000 cpm). Nach Ablauf des genannten Zeitraums wurde das Medium abgezogen, und die Zellen wurden vor deren Lyse mit 1M Natriumhydroxid gewaschen. Das Zellysat wurde anschließend hinsichtlich gebundenem radioaktiven TNF ausgewertet. Die spezifische Bindung von markiertem TNF an die Zellen wurde sodann ermittelt.

Die bei diesem Assay mit MAb 32, MAb 47 und einem Kontroll-MAb erhaltenen Ergebnisse sind in Figur 12 dargelegt.

Die bei dem Verklumpungsassay unter Verwendung von in Gegenwart von TNF und Anti-TNF-MAb kultivierten BAE-Zellen erhaltenen Ergebnisse korrelieren mit den Ergebnissen, die im BAE-Radiorezeptorassay erhalten wurden, d.h. MAb, welche die Induktion von Gerinnungsfaktoren auf der Oberfläche von Endothelzellen inhibieren (wie durch die Steigerung der Gerinnungszeit im Vergleich zu TNF alleine gezeigt wurde), inhibieren auch die Bindung von TNF an seinen Rezeptor. Dies wird durch die MAb 32 und 47 beispielhaft veranschaulicht.

Der MAb 32, welcher die TNF-Bindung an WEHI-164-Zellen nicht inhibiert, inhibiert die Bindung von TNF an Endothelzellen. Dieses Ergebnis stützt die Hypothese, daß auf dem TNF-Molekül unterschiedliche funktionelle Stellen existieren, und daß diese Stellen mit unterschiedlichen Rezeptor-Subpopulationen auf verschiedenen Zelltypen interagieren. Demgemäß sind Liganden, welche an definierte Regionen des TNF binden, in der Lage, die biologischen Effekte von TNF zu modifizieren, indem seine Bindung an bestimmte Rezeptor-Subtypen limitiert wird.

Wie in Figur 12 dargestellt, ist der MAb 47 ein besonders potenter Inhibitor der TNF-Interaktion mit Endothelzellen, wobei die prozentuale spezifische Bindung bei einer Verdünnung von 1/100 bis 1/10 000 effektiv Null ist.

15 UNTERSUCHUNGEN ZUR REZEPTORBINDUNG VON MIT MAb 32 KOMPLEXIERTEM HUMANEM TNF AN HUMANE KARZINOMZELLINIEN IN VITRO

Es ist gezeigt worden, daß der MAb 32 die Anti-Tumor-Aktivität von humanem TNF verstärkt. Die der Verstärkung zugrundeliegenden Mechanismen können eine Beschränkung der TNF-Bindung an bestimmte (Tumor) Rezeptor-Subtypen, nicht aber an andere (endotheliale) einschließen mit nachfolgender Verminderung der TNF-Toxizität gegenüber Nicht-Tumorzellen. Dieser Mechanismus erfordert bei in vitro-Assays keine erhöhte Aufnahme von TNF durch Tumorzellen. Zusätzlich potenziert der MAb 32 auch die direkte Bindung des humanen TNF an TNF-Rezeptoren auf bestimmten humanen Karzinomzelllinien.

Materialien und Methoden

Die folgenden humanen Karzinomzelllinien sind hinsichtlich der verstärkten, Rezeptor-vermittelten Aufnahme von TNF in Gegenwart von MAb 32 analysiert worden: B10, CaCo, HT 29, SXC01 (sämtlichst Colonkarzinome, 5637 (Blasenkarzinom), MM418E (Melanom), IGR3 (Melanom), MCF 7 (Mammakarzinom). Die Zellen wurden entweder in RPMI-1640 (MM418E), DMEM (CaCo und IGR 3) oder in Iscoves-modifiziertem DMEM (B10, HT 29, SK01, S637, MCF 7) propagiert, ergänzt mit 10 % fötalem Kälberserum, Penicillin/Strep-

tomycin und L-Glutamin. Die Rezeptorassays wurden wie zuvor für die Endothelzellen beschrieben durchgeführt mit der Abweichung, daß die Inkubationszeit mit iodiertem TNF für alle bis auf die B10-Zellen, welche mit der radioaktiven Markierung 1 Stunde lang inkubiert wurden, auf 3 Stunden verlängert wurde.

ERGEBNISSE

Eine erhöhte TNF-Aufnahme in Gegenwart von MAb 32 durch die untersuchten Melanomzelllinien MM418E und IGR 3 (Fig. 13 und 14), dem Blasenkarzinom 5637 (Fig. 15) und dem Mammakarzinom MCF 7 (Fig. 16) wurde beobachtet. Der MAb 32 führte bei keiner der anderen Zelllinien zu einer Beeinflussung der TNF-Rezeptor-Interaktion, wie durch B10 (Fig. 17) gezeigt wird. Der MAb 47, von dem gezeigt worden ist, daß er die TNF-Bindung an WEHI-164-Zellen und Endothelzellen inhibiert, und welcher ebenfalls die TNF-vermittelte Tumorrückbildung inhibiert, führte zu einer bemerkenswerten Inhibition der TNF-Bindung an sämtliche der untersuchten Zelllinien (Fig. 13-17).

SCHLUßFOLGERUNGEN

Die Rezeptorbindungsanalysen haben einen zweiten Mechanismus aufgezeigt, durch den der MAb 32 die Anti-Tumor-Aktivität von TNF potenzieren kann. Dieser zweite Weg zur Verstärkung des TNF resultiert aus der erhöhten Aufnahme von TNF durch sämtliche Tumorrezeptoren in Gegenwart von MAb 32.

VERSTÄRKUNG DER TNF-VERMITTELTEN TUMORRÜCKBILDUNG IN VIVO DURCH MAb 32 ODER UNIVALENTE FAB'-FRAGMENTE VON MAB 32

Die Untersuchungen zur Tumorrückbildung wurden wie oben beschrieben mit Mäusen durchgeführt, die subkutane WEHI-164-Tumore aufwiesen (N = 5 Tiere/Gruppe). Die Ermittlung der Tumorgroße erfolgte täglich während der gesamten Dauer des Experiments. Die unter Verwendung von MAb 32 erhaltenen Ergebnisse sind in Fig. 22 dargestellt und zeigen die mittlere, prozentuale Standardabweichung der Veränderung des Tumorbereichs zum Zeitpunkt der Beendigung der Behandlung (Tag 2) (■ MAb 32: □ Kon-

troll-MAb: "Mab 47"). Die zwischen den mit dem Kontroll-MAb-TNF und den mit MAb 32-TNF behandelten Gruppen beobachteten Unterschiede erweisen sich in einem T-Test bei $p < 0,01$ als statistisch signifikant.

5 Die unter Verwendung der univalenten Fab'-Fragmente von MAb 32 erhaltenen Ergebnisse sind in Fig. 19 dargestellt. Die Ermittlung der Tumorgroße erfolgte täglich während der gesamten Dauer des Experiments. Die Ergebnisse zeigen die mittlere prozentuale Standardabweichung der Veränderung des Tumorbereichs
10 zum Zeitpunkt der Beendigung der Behandlung (Tag 2). Die Unterschiede zwischen den mit dem Kontroll-MAb-10F und den mit MAb 32-TNF behandelten Gruppen erweisen sich in einem T-Test bei $p < 0,01$ als statistisch signifikant.

15 TNF-INDUZIERTER TUMORRÜCKBILDUNG: EFFEKT VON ANTI-PEPTID 301-SEREN

Die Fig. 20 zeigt die prozentuale Veränderung des Tumorbereichs in Tumor-tragenden Mäusen, die 3 Tage lang mit TNF plus Kontroll-MAb (Antikörper gegen bovines Wachstumshormon), TNF
20 plus MAb 32 oder TNF plus Antiserum (Globulinfraktion) gegen das Peptid 301 behandelt wurden. In einem ungepaarten T-Test unterscheidet sich die Kontrollgruppe signifikant von beiden Testgruppen (MAb 32, Antiserum 301), während sich die mit MAb 32 und mit Peptid-Antiserum 301 behandelten Gruppen untereinander nicht
25 signifikant unterscheiden. (Kontrolle gg. MAb 32, $p < 0,002$; Kontrolle gg. Antipeptid 301, $p < 0,025$). Demgemäß verursachen Antiseren, die unter Verwendung eines Peptids generiert wurden, welches einen Teil der MAb 32-Spezifität umfaßt, ebenfalls eine TNF-Verstärkung der Tumorrückbildung.

30 Wie in Fig. 9 dargestellt wird, haben Kompetitions-Bindungsstudien gezeigt, daß die 13 monoklonalen Antikörper in zwei Hauptgruppen unterteilt werden können, nämlich MAb 1, 21, 47, 54, 37, 32 und 25, und MAb 11, 12, 53 und 42. Anschließend wurden Experimente durchgeführt, um die Regionen des humanen
35 TNFs zu identifizieren, die von diesen monoklonalen Antikörpern erkannt werden.

IDENTIFIZIERUNG VON REGIONEN DES HUMANEN TNF, DIE VON MONOKLO-
NALEN ANTIKÖRPERN ERKANNT WERDEN

Methoden

- 5 1. Überlappende Peptide mit einer Länge von 7 und 10 Aminosäu-
reresten wurden auf Polypropylenpins synthetisiert nach dem
Verfahren von Geysen et al., 1984, PNAS 81, 3998-4002. Die Über-
lappung betrug 6 bzw. 9 Reste, und gemeinsam deckten die Peptide
die gesamte Aminosäuresequenz von TNF ab. Die Peptide wurden
10 hinsichtlich der Reaktivität gegenüber den MAb's durch ELISA
untersucht. MAb's, die die TNF-Reaktivität aus der vorhergehenden
Inkubation mit vollständigem TNF absorbiert hatten, wurden eben-
falls auf Reaktivität gegenüber den Peptiden untersucht und
dienten als negative Kontrolle.
- 15 2. Längere Peptide von TNF wurden wie nachfolgend beschrieben
synthetisiert. Diese Peptide wurden verwendet, um nach der fol-
genden Vorgehensweise Antiseren in Schafen zu generieren. Meri-
no-Schafe erhielten eine erste Injektion mit TNF-Peptid, kon-
jugiert mit Ovalbumin und emulgiert in Freund's vollständigem
20 Adjuvans, und erhielten in Abständen von 4 Wochen Boost-Injek-
tionen mit Peptid-Ovalbumin, und die Seren wurden mittels Radio-
immunoassay auf Anwesenheit von Anti-TNF-Antikörpern untersucht.
Unter den genannten Peptiden führten lediglich die Peptide 275,
301, 305, 306 und 307 zu Seren, die mit dem gesamten TNF reagie-
25 ren. Die positiven Seren wurden anschließend in kompetitiven
Bindungsassays (PACT-Assays) mit den MAb's eingesetzt.

Die folgenden Peptide wurden synthetisiert und werden unter
Verwendung des üblichen Dreibuchstabenkodes für jede Aminosäure
beschrieben, wobei die TNF-Sequenzregion in Klammern angegeben
30 ist.

Peptid 275

H-Ala-Lys-Pro-Trp-Tyr-Glu-Pro-Ile-Tyr-Leu-OH (111-120)

Peptid 301

- 35 H-Val-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-Thr-Pro-Ser-Asp-Lys-Pro-Val-Ala-His-
Val-Val-Ala-OH (1-18)

Peptid 302

H-Leu-Arg-Asp-Asn-Gln-Leu-Val-Val-Pro-Ser-Glu-Gly-Leu-Tyr-Leu-Ile-OH (43-58)

Peptid 304

- 5 H-Leu-Phe-Lys-Gly-Gln-Gly-Cys-Pro-Ser-Thr-His-Val-Leu-Leu-Thr-His-Thr-Ile-Ser-Arg-Ile-OH (63-83)

Peptid 305

H-Leu-Ser-Ala-Glu-Ile-Asn-Arg-Pro-Asp-Tyr-Leu-Asp-Phe-Ala-Glu-Ser-Gly-Gln-Val-OH (132-150)

- 10 Peptid 306

H-Val-Ala-His-Val-Val-Ala-Asn-Pro-Gln-Ala-Glu-Gly-Gln-Leu-OH (13-26)

Peptid 307

- 15 H-Ala-Glu-Gly-Gln-Leu-Gln-Trp-Leu-Asn-Arg-Arg-Ala-Asn-Ala-Leu-Leu-Ala-Asn-Gly-OH (22-40)

Peptid 308

H-Gly-Leu-Tyr-Leu-Ile-Tyr-Ser-Gln-Val-Leu-Phe-Lys-Gly-Gln-Gly-OH (54-68)

Peptid 309

- 20 H-His-Val-Leu-Leu-Thr-His-Thr-Ile-Ser-Arg-Ile-Ala-Val-Ser-Thr-Gln-Thr-Lys-Val-Asn-Leu-Leu-COOH (73-94)

Peptid 323

H-Thr-Ile-Ser-Arg-Ile-Ala-Val-Ser-Thr-Gln-Thr-OH (79-89)

- 25 Diese Peptide wurden nach der folgenden allgemeinen Vorgehensweise synthetisiert.

Die Synthese sämtlicher Peptide erfolgte unter Anwendung des Fmoc-Polyamid-Verfahrens der Festphasen-Peptidsynthese (Atherton et al., 1978, J. Chem. Soc. Chem. Commun., 13, 537-539).

- 30 Das verwendete feste Harz war PepSyn KA, welches ein Polydimethylacrylamidgel auf einem Kieselgur-Träger ist mit 4-Hydroxyethylphenoxyessigsäure als funktionalisiertem Linker (Atherton et al., 1975, J. Am. Chem. Soc. 97, 6584-6585).

- 35 Die carboxyterminale Aminosäure wurde an den festen Träger mittels einer DCC/DMAP-vermittelten symmetrischen Anhydridveresterung angeheftet.

Sämtliche Fmoc-Gruppen wurden durch Waschung mit Piperidin/DMF entfernt, und die Peptidbindungen wurden entweder über aktive Pentafluorphenylester oder direkt durch BOP/NMM/HOBt (Castro's Reagens) gebildet (Fournier et al., 1989, Int. J. Peptide Protein Res., 33, 133-139), wobei bestimmte Aminosäuren gemäß Darlegung in Tabelle 5 ausgenommen wurden.

Der für die Aminosäuren gewählte Schutz der Seitenkette wurde gleichzeitig während der Abspaltung mit Ausnahme von AcM am Cystein entfernt, welches nach der Synthese belassen wurde.

TABELLE 5

<u>Aminosäure</u>	<u>Schutzgruppe</u>	<u>Kopplungsverfahren</u>
Arg	Mtr oder Pmc	Beide
15 Asp	OBu	Beide
Cys	AcM (permanent)	Beide
Glu	OBu	Beide
His	Boc	nur OPfp
Lys	Boc	Beide
20 Ser	But	nur BOP
Thr	But	nur BOP
Tyr	But	Beide
Trp	keine	Beide
Asn	keine	nur OPfp
25 Gln	keine	nur OPfp

Abspaltung und Reinigung

30 Die Peptide 301, 302 und 305 wurden von dem Harz mit 95 % TFA und 5 % Thioanisol (1,5 Std.) abgespalten und über eine Umkehrphasen-C4-Säule gereinigt (Puffer A - 0,1 % wäßrige TFA, Puffer B - 80 % ACN 20 % A).

35 Die Peptide 303 und 304 wurden von dem Harz mit 95 % TFA und 5 % Phenol (5-6 Std.) abgespalten und über eine Umkehrphasen-C4-Säule gereinigt. (Puffer wie oben).

Die Peptide 306 und 308 werden von dem Harz mit 95 % TFA und 5 % Wasser (1,5 Std.) abgespalten und über eine Umkehrphasen-C4-Säule gereinigt. (Puffer wie oben).

Das Peptid 309 wurde von dem Harz mit 95 % TFA und 5 % Thioanisol abgespalten und über eine Umkehrphasen-C4-Säule gereinigt. (Puffer wie oben).

Das Peptid 307 wurde von dem Harz mit einer Mischung von 93 % TFA, 3,1 % Anisol, 2,97 % Ethylmethylsulfid und 0,95 % Ethandithiol (3 Std.) abgespalten und über eine Umkehrphasen-C4-Säule gereinigt. (Puffer wie oben).

ERGEBNISSE

Typische Ergebnisse aus dem MAb-ELISA unter Verwendung der 7- und 10-mere sind in Fig. 21 dargestellt. Zusammen mit den Ergebnissen der PACT-Assays unter Verwendung der Anti-Peptid-Seren der Schafe (dargestellt in Tabelle 6) enthalten die folgenden Regionen von TNF die Bindungsstellen der Anti-TNF-MAbs.

MAb 1	:	Reste 1-18, 58-65, 115-125, 138-149
MAb 11:		Reste 49-98
MAb 12:		Reste 22-40, 70-87
MAb 21:		Reste 1-18, 76-90
MAb 25:		Reste 12-22, 36-45, 96-105, 132-157
MAb 32:		Reste 1-26, 117-128, 141-153
MAb 37:		Reste 22-31, 146-157
MAb 42:		Reste 22-40, 49-96, 110-127, 136-153
MAb 47:		Reste 1-18, 108-128
MAb 53:		Reste 22-40, 69-97, 105-128, 135-155
MAb 54:		Reste 56-79, 110-127, 136-155

TABELLE 6KOMPETITIVE BINDUNG VON TNF DURCH MONOKLONALE ANTI-TNF-
ANTIKÖRPER IN GEGENWART VON ANTI-PEPTID-SEREN

5

MAb/Peptid-Seren

	275	301	305	306	307
1	-	+	-	-	-
10 11	-	+/-	-	-	-
12	-	+	-	-	++
21	-	++	-	-	-
25	-	+	-	-	-
32	-	++++	+	+	-
15 37	-	+	+/-	-	+
47	-	+	-	-	-
53	-	+	-	-	+
54	-	+	-	-	-
20 42	-	+	+	-	+

Bemerkung 1: - bedeutet keine Konkurrenz, + bedeutet leichte Konkurrenz bei hoher Konzentration an Anti-Peptid-Antiseren (1/50), ++++ bedeutet starke Konkurrenz durch Anti-Peptid-Seren gleich derjenigen des homologen MAb's.

Bemerkung 2: In diesem Assay wurden lediglich Peptide eingesetzt, die zu Seren führten, welche den gesamten TNF erkannten.

30 SCHLUßFOLGERUNGEN

Eine Kartierung der von jedem der MAb's erkannten Regionen hat gezeigt, daß die MAb's der Gruppe I (MAb's 1, 21, 47, 54, 37, 32 und 25) mit Ausnahme der MAb's 37 und 54 den TNF gemäß Darstellung auf dem schematischen Diagramm in der Region der Reste 1-18 binden, während die MAb's der Gruppe II des schematischen Diagramms (MAb's 11, 12, 53 und 42) den TNF in der Region der Reste 70-96 binden, welche eine sogenannte palindromische

Schleife der dreidimensionalen Struktur des TNF einschließt. Die MABs, welche die Aktivität zur Induktion endothelialer Gerinnungsfaktorvorstufen inhibieren (MABs 1, 32, 42, 47, 54 und 53), binden sämtlichst in der Region der Reste 108-128, welche wiederum eine Schleifenstruktur in dem dreidimensionalen Modell enthält und darauf hinweisen kann, daß diese Region mit TNF-Rezeptoren interagiert, die auf Endothelzellen, nicht aber auf Tumorzellen gefunden werden. Der MAB 32, welcher die in vivo-Tumorrückbildung und die antivirale Aktivität des TNF potenziert, ist der einzige Antikörper, der sämtliche der mit den Resten 1-26, 117-128 und 141-153 assoziierten Schleifenregionen bindet, und somit ist die Bindung an diese Regionen entscheidend für eine verstärkte TNF-Bioaktivität bei gleichzeitiger Verringerung der Toxizität für normale Zellen.

Wie sich aus Tabelle 2 ergibt, üben die MABs 1, 47 und 54 denselben Effekt auf die Bioaktivität von TNF aus. Aus den oben dargelegten Ergebnissen wird gefolgert, daß diese drei monoklonalen Antikörper an ähnliche Regionen des TNF-Moleküls binden. Demgemäß wird davon ausgegangen, daß ein Ligand, welcher an TNF in mindestens zwei Regionen bindet, ausgewählt aus der Gruppe bestehend hauptsächlich aus der Region der Reste 1-20, der Region der Reste 56-77, der Region der Reste 108-128, und der Region der Reste 138-149, die Bioaktivität von TNF in einer Weise beeinflussen wird, die derjenigen der MABs 1, 47 und 54 ähnlich ist. Gleichermäßen wird davon ausgegangen, daß ein Ligand, welcher an TNF hauptsächlich in den Region der Reste 1-20 und 76-90 bindet, denselben Effekt auf die Bioaktivität von TNF ausübt wie der MAB 21. Ein Ligand, der an TNF hauptsächlich in den Regionen der Reste 22-40 und 69-97 bindet, wird den gleichen Effekt auf die Bioaktivität von TNF ausüben wie der MAB 12. Von einem Liganden, der an TNF hauptsächlich in den Regionen der Reste 1-30, 117-128 und 141-153 bindet, würde man erwarten, daß er denselben Effekt auf die Bioaktivität von TNF ausübt wie der MAB 32, und von einem Liganden, der an TNF hauptsächlich in den Regionen der Reste 22-40, 49-97, 110-127 und 136-153 bindet, würde man erwarten, daß er denselben Effekt auf die Bioaktivität von TNF ausübt

wie der MAb 42. Von einem Liganden, der an TNF hauptsächlich in den Regionen der Reste 22-31 und 146-157 bindet, würde man erwarten, daß er denselben Effekt auf die Bioaktivität von TNF ausübt wie der MAb 37, und von einem Liganden, der an TNF hauptsächlich in den Regionen der Reste 22-40, 69-97, 105-128 und 135-155 bindet, würde man erwarten, daß er denselben Effekt auf die Bioaktivität von TNF ausübt wie der MAb 53.

Die Erfinder der vorliegenden Anmeldung haben deutlich gezeigt, daß die Bioaktivität von TNF durch die Bindung eines Liganden an den TNF verändert werden kann, und daß der Effekt auf die Bioaktivität eine Funktion der Spezifität des Liganden ist. Beispielsweise resultiert die Bindung des MAb 32 an TNF in den Regionen der Reste 1-26, 117-128 und 141-153 in der TNF-Aktivität zur Induktion von endothelialen Gerinnungsfaktorvorstufen, und eine Bindung von TNF an Rezeptoren auf Endothelzellen wird inhibiert, die Aktivitäten des TNF zur Induktion der Tumor-Fibrinablagerung und zur Tumorrückbildung werden verstärkt, und die Zytotoxizität wird unbeeinflusst und die Aktivitäten des TNF zur Tumor-Rezeptorbindung werden unbeeinflusst oder verstärkt. Es wird davon ausgegangen, daß dieser Effekt auf die Bioaktivität des TNF auf die Verhinderung der Bindung des durch den MAb 32 erkannten Epitops des TNF an natürlich vorkommende, biologisch aktive Liganden zurückgeführt werden kann.

Demgemäß wird davon ausgegangen, daß ein zum MAb 32 ähnlicher Effekt auch durch einen Liganden erzielt werden könnte, der an eine Region von TNF derart bindet, daß das Epitop, welches durch den MAb 32 erkannt wird, an der Bindung an natürlich vorkommende, biologisch aktive Liganden gehindert wird. Diese Verhinderung der Bindung kann auf eine sterische Behinderung oder auf andere Mechanismen zurückzuführen sein.

Demgemäß ist es beabsichtigt, daß die Verhinderung der Bindung von Epitopen, die von den zahlreichen, vorliegend beschriebenen monoklonalen Antikörpern erkannt werden, an natürlich vorkommende, biologisch aktive Liganden innerhalb des Schutzbereichs der vorliegenden Erfindung liegt.

Patentansprüche für die Vertragsstaaten:

CH, DE, DK, FR, GB, IT, LI, NL und SE

1. Antikörper oder Antikörperfragment mit der Fähigkeit zur Bindung an TNF, wobei der Antikörper oder das Antikörperfragment dadurch gekennzeichnet ist, daß, wenn er bzw. es an TNF bindet, die Aktivität des TNF zur Induktion von endothelialen Gerinnungsfaktorvorstufen inhibiert wird, wobei der Antikörper oder das Antikörperfragment derart an den TNF bindet, daß das Epitop des TNF, definiert durch die topographische Region von 1-18, 58-65, 115-125 und 138-149, oder die topographische Region der Reste 1-18 und 108-128, oder die topographische Region der Reste 56-79, 110-127 und 135-155, oder die topographische Region der Reste 1-30, 117-128 und 141-153, oder die topographische Region der Reste 1-18, oder die topographische Region der Reste 22-40, 49-97, 110-127 und 136-153, oder die topographische Region der Reste 1-20 und 76-90, oder die topographische Region der Reste 22-40, 69-97, 105-128 und 135-155, im wesentlichen an der Bindung an natürlich vorkommende, biologisch aktive Liganden gehindert wird.
2. Antikörper oder Antikörperfragment nach Anspruch 1, wobei der Antikörper oder das Antikörperfragment ferner dadurch gekennzeichnet ist, daß, wenn er bzw. es an TNF bindet, die Aktivitäten des TNF zur Tumorrückbildung, zur Induktion der Tumor-Fibrinablagerung, zur Zytotoxizität und zur Rezeptorbindung inhibiert werden, wobei der Antikörper oder das Antikörperfragment derart an den TNF bindet, daß das Epitop des TNF, definiert durch die topographischen Regionen der Reste 1-18, 58-65, 115-125 und 138-149, oder die topographische Region der Reste 1-18 und 108-128, oder die topographische Region der Reste 56-79, 110-127 und 135-155, im wesent-

lichen an der Bindung an natürlich vorkommende, biologisch aktive Liganden gehindert wird.

3. Antikörper oder Antikörperfragment nach Anspruch 1 oder 2, wobei der Antikörper oder das Antikörperfragment ein monoklonaler Antikörper, ausgewählt aus MAb 1 (ECACC 89080301), MAb 54 (ECACC 89083103) und MAb 47 (ECACC 89121402), oder ein Fragment davon ist.
4. Verwendung eines Antikörpers oder eines Antikörperfragments gemäß Anspruch 2 oder 3 bei der Herstellung eines Mittels zur Behandlung eines Toxinschocks.
5. Antikörper oder Antikörperfragment nach Anspruch 1, wobei der Antikörper oder das Antikörperfragment ferner dadurch gekennzeichnet ist, daß, wenn er bzw. es an TNF bindet, die Bindung des TNF an Rezeptoren auf Endothelzellen inhibiert wird, die Aktivitäten des TNF zur Induktion der Tumor-Fibrinablagerung und zur Tumorrückbildung verstärkt werden, die Zytotoxizität des TNF nicht beeinflußt wird, und die Aktivität des TNF zur Bindung an den Tumorrezeptor nicht beeinflußt oder verstärkt wird, wobei der Antikörper oder das Antikörperfragment derart an TNF bindet, daß das Epitop des TNF, definiert durch die topographische Region der Reste 1-30, 117-128 und 141-153 oder die topographische Region der Reste 1-18, im wesentlichen an der Bindung an natürlich vorkommende, biologisch aktive Liganden gehindert wird.
6. Antikörper oder Antikörperfragment nach Anspruch 5, wobei der Antikörper oder das Antikörperfragment an den humanen TNF in den topographischen Regionen der Reste 1-26, 117-128 und 141-153 bindet.
7. Antikörper oder Antikörperfragment nach Anspruch 6, wobei der Antikörper oder das Antikörperfragment der MAb 32 (ECACC 89080302) oder ein Fragment davon ist.

8. Antikörper oder Antikörperfragment nach Anspruch 5, wobei der Antikörper oder das Antikörperfragment an die Reste 1-18 des humanen TNF (Peptid 301) bindet.
9. Antikörper oder Antikörperfragment nach Anspruch 1, wobei der Antikörper oder das Antikörperfragment ferner dadurch gekennzeichnet ist, daß, wenn er bzw. es an TNF bindet, die Aktivitäten des TNF zur Zytotoxizität und Tumorrückbildung nicht beeinflußt werden, die Aktivität des TNF zur Induktion der Tumor-Fibrinablagerung inhibiert wird, und die Aktivitäten des TNF zur Rezeptorbindung nicht beeinflußt werden, wobei der Antikörper oder das Antikörperfragment derart an TNF bindet, daß das Epitop des TNF, definiert durch die topographischen Regionen der Reste 22-40, 49-97, 110-127 und 136-153, im wesentlichen an der Bindung an natürlich vorkommende, biologisch aktive Liganden gehindert wird.
10. Antikörper oder Antikörperfragment nach Anspruch 9, wobei der Antikörper oder das Antikörperfragment der MAb 42 (ECACC 89080304) oder ein Fragment davon ist.
11. Verwendung eines Antikörpers oder eines Antikörperfragments gemäß einem der Ansprüche 5 bis 10 bei der Herstellung eines Mittels zur Behandlung von Tumoren, die durch die Wirkung von TNF inhibiert werden.
12. Verwendung nach Anspruch 11, bei der der Tumor ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus Melanom, Mamma- und Blasenkarzinomen.
13. Produkt, enthaltend einen Antikörper oder ein Antikörperfragment gemäß einem der Ansprüche 5 bis 10 und ein zytotoxisches Arzneimittel zur simultanen, sequentiellen oder gesonderten Verabreichung im Rahmen einer Krebstherapie.

14. Produkt nach Anspruch 13, bei dem das zytotoxische Arzneimittel ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Vinblastin, Azyklovir, Interferon- α , IL-2, Dactinomycin, AZT, Adriamycin, Mytomycin C, Zytosinarabinosid, Daunorubicin, Cisplatin, Vincristin, 5-Fluorouracil und Bleomycin.
15. Antikörper oder Antikörperfragment nach Anspruch 1, wobei der Antikörper oder das Antikörperfragment ferner dadurch gekennzeichnet ist, daß, wenn er bzw. es an TNF bindet, die Aktivität des TNF zur Tumor-Fibrinablagerung verstärkt und die Aktivitäten des TNF zur Zytotoxizität, zur Tumorrückbildung und zur Rezeptorbindung inhibiert werden, wobei der Antikörper oder das Antikörperfragment derart an TNF bindet, daß das Epitop des TNF, definiert durch die topographischen Regionen der Reste 1-20 und 76-90, im wesentlichen an der Bindung an natürlich vorkommende, biologisch aktive Liganden gehindert wird.
16. Antikörper oder Antikörperfragment nach Anspruch 15, wobei der Antikörper oder das Antikörperfragment an TNF in den Regionen der Reste 1-18 und 76-90 bindet.
17. Antikörper oder Antikörperfragment nach Anspruch 15 oder 16, wobei der Antikörper oder das Antikörperfragment der MAb 21 (ECACC 90012432) oder ein Fragment davon ist.
18. Antikörper oder Antikörperfragment nach Anspruch 1, wobei der Antikörper oder das Antikörperfragment ferner dadurch gekennzeichnet ist, daß, wenn er bzw. es an TNF bindet, die Aktivität des TNF zur Tumor-Fibrinablagerung nicht beeinflußt wird und die Aktivitäten des TNF zur Zytotoxizität, zur Tumorrückbildung und zur Rezeptorbindung inhibiert werden, wobei der Antikörper oder das Antikörperfragment derart an TNF bindet, daß das Epitop des TNF, definiert durch die topographischen Regionen der Reste 22-40, 69-97, 105-128 und

135-155, im wesentlichen an der Bindung an natürlich vorkommende, biologisch aktive Liganden gehindert wird.

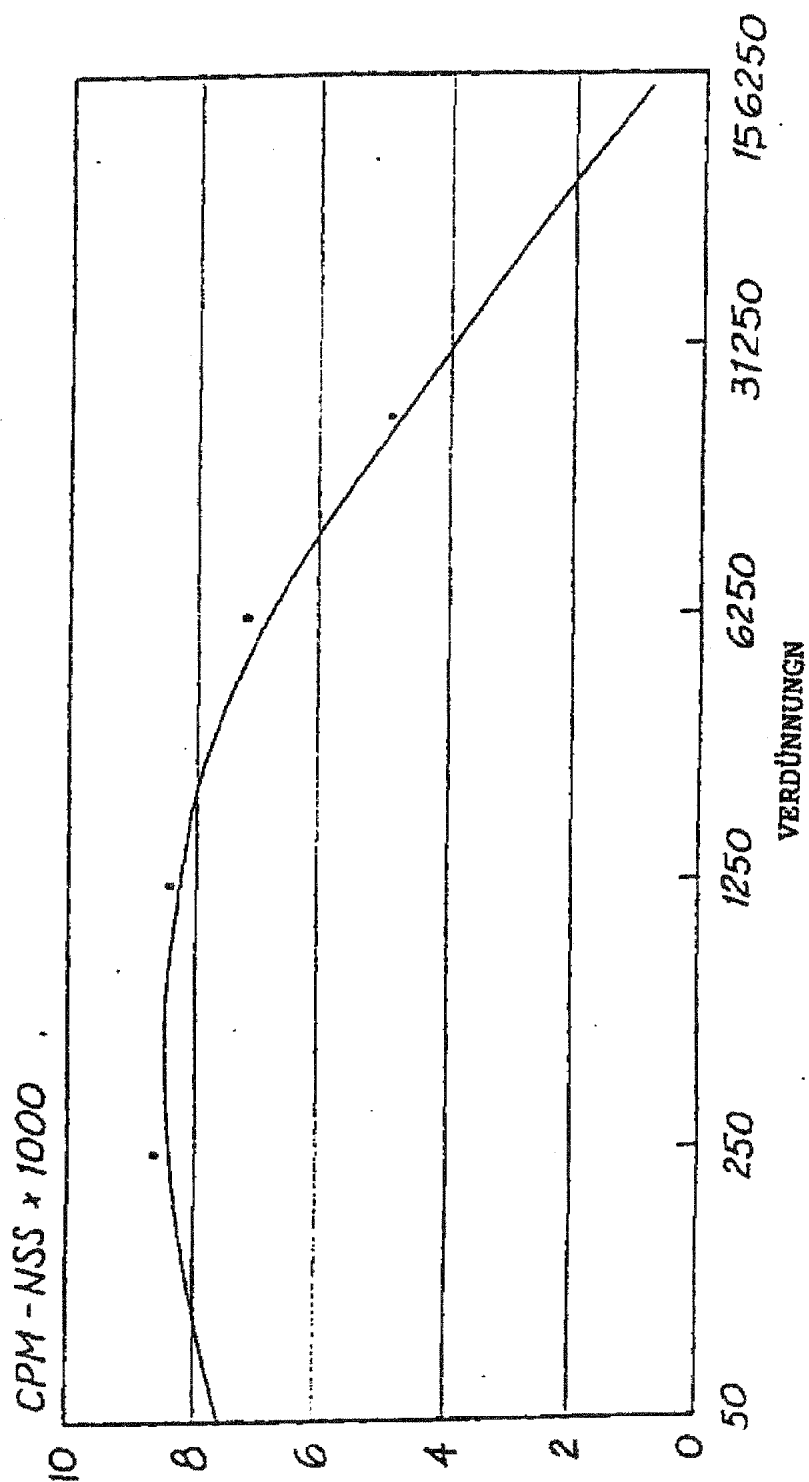
19. Antikörper oder Antikörperfragment nach Anspruch 18, wobei der Antikörper oder das Antikörperfragment der MAb 53 (ECACC 90012433) oder ein Fragment davon ist.
20. Antikörper oder Antikörperfragment mit der Fähigkeit zur Bindung an den humanen TNF in der Weise, daß, wenn er bzw. es an TNF bindet, die Aktivität des TNF zur Tumor-Fibrinablagerung verstärkt wird, die Aktivität des TNF zur Induktion von endothelialen Gerinnungsfaktorvorstufen nicht beeinflußt wird, und die Aktivitäten des TNF zur Zytotoxizität, zur Tumorrückbildung und zur Rezeptorbindung inhibiert werden, dadurch gekennzeichnet, daß, wenn der Antikörper oder das Antikörperfragment an den TNF bindet, das Epitop des TNF, definiert durch die topographischen Regionen der Reste 12-22, 36-45, 96-105 und 132-157, im wesentlichen an der Bindung an natürlich vorkommende, biologisch aktive Liganden gehindert wird, und/oder daß der Antikörper oder das Antikörperfragment an den humanen TNF in den topographischen Regionen der Reste 12-22, 36-45, 96-105 und 132-157 bindet.
21. Antikörper oder Antikörperfragment nach Anspruch 20, wobei der Antikörper oder das Antikörperfragment der MAb 25 (ECACC 89121401) oder ein Fragment davon ist.
22. Antikörper oder Antikörperfragment mit der Fähigkeit zur Bindung an den humanen TNF in der Weise, daß die Aktivitäten des TNF zur Tumor-Fibrinablagerung, zur Induktion von endothelialen Gerinnungsfaktorvorstufen, zur Zytotoxizität, zur Tumorrückbildung und zur Rezeptorbindung nicht beeinflußt werden, dadurch gekennzeichnet, daß, wenn der Antikörper oder das Antikörperfragment an den TNF bindet, das Epitop des TNF, definiert durch die topographischen Regionen der

Reste 22-31 und 146-157, im wesentlichen an der Bindung an natürlich vorkommende, biologisch aktive Liganden gehindert wird, und/oder daß der Antikörper oder das Antikörperfragment an den humanen TNF in den topographischen Regionen der Reste 22-31 und 146-157 bindet.

23. Antikörper oder Antikörperfragment nach Anspruch 22, wobei der Antikörper oder das Antikörperfragment der MAb 37 (ECACC 89090303) oder ein Fragment davon ist.
24. Antikörper oder Antikörperfragment mit der Fähigkeit zur Bindung an den humanen TNF in der Weise, daß die Aktivität des TNF zur Induktion von endothelialen Gerinnungsfaktorstufen nicht beeinflußt wird, und die Aktivitäten des TNF zur Zytotoxizität, zur Tumorrückbildung, zur Tumor-Fibrinablagerung und zur Rezeptorbindung inhibiert werden, dadurch gekennzeichnet, daß, wenn der Antikörper oder das Antikörperfragment an den TNF bindet, das Epitop des TNF, definiert durch die topographischen Regionen der Reste 22-40 und entweder 49-98 oder 70-87, im wesentlichen an der Bindung an natürlich vorkommende, biologisch aktive Liganden gehindert wird, und/oder daß der Antikörper oder das Antikörperfragment an den humanen TNF in der topographischen Region der Reste 22-40 und entweder 49-98 oder 70-87 bindet, wobei der Antikörper nicht der Antikörper AM-195 ist, der durch die Zelllinie ECACC 87050801 sekretiert wird.
25. Zusammensetzung, umfassend TNF und einen Antikörper oder ein Antikörperfragment gemäß einem der Ansprüche 1-3, 5-10 oder 15-24, bei der der Ligand an den TNF gebunden ist.
26. Antikörper oder Antikörperfragment nach einem der Ansprüche 1-3, 5-10 oder 15-24 zur medizinischen Verwendung.

1/33

TNF Mab 001
TITER-ASSAY



LEGENDE : - - - - - TNF 001

FIG. 1

2/33

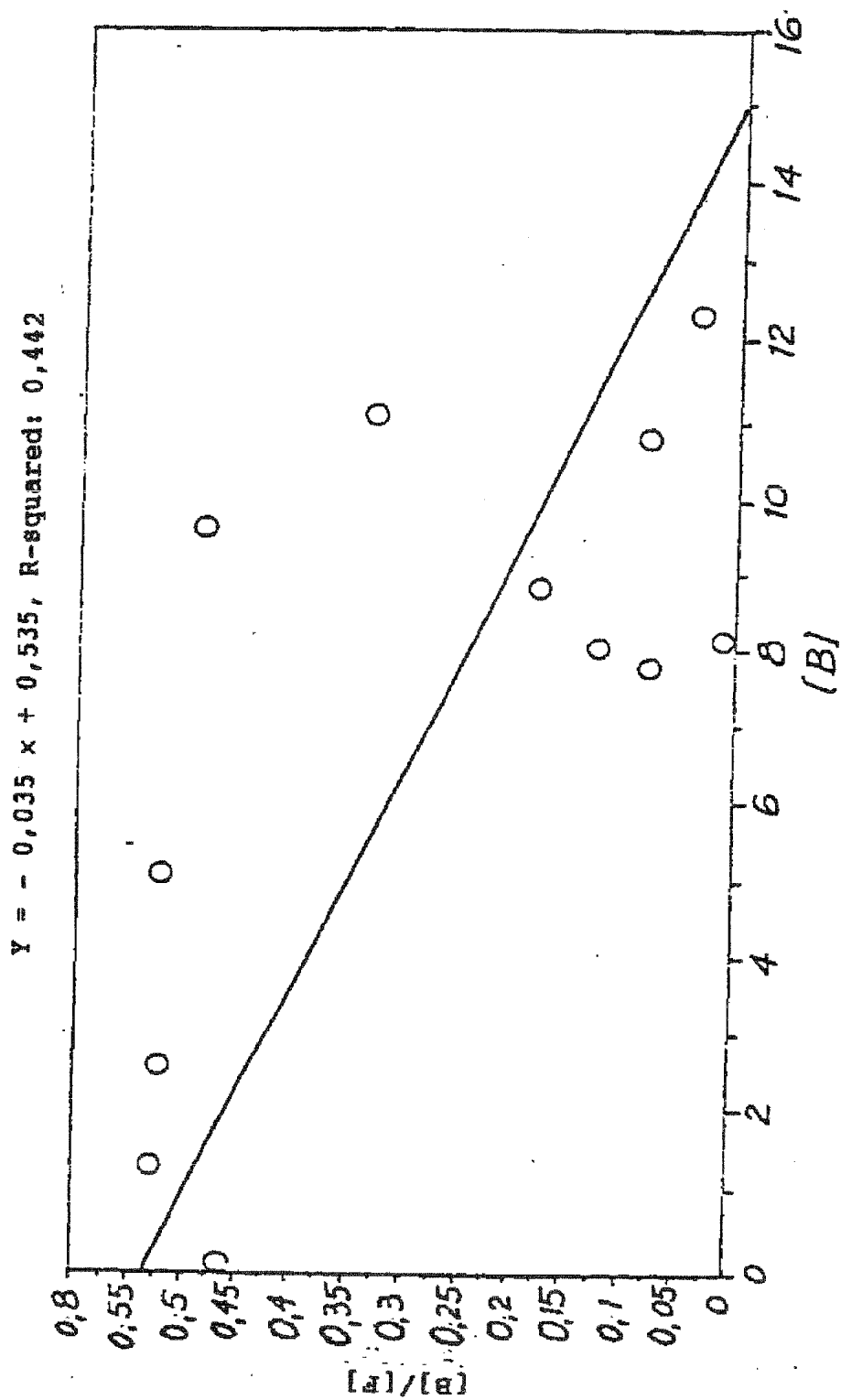
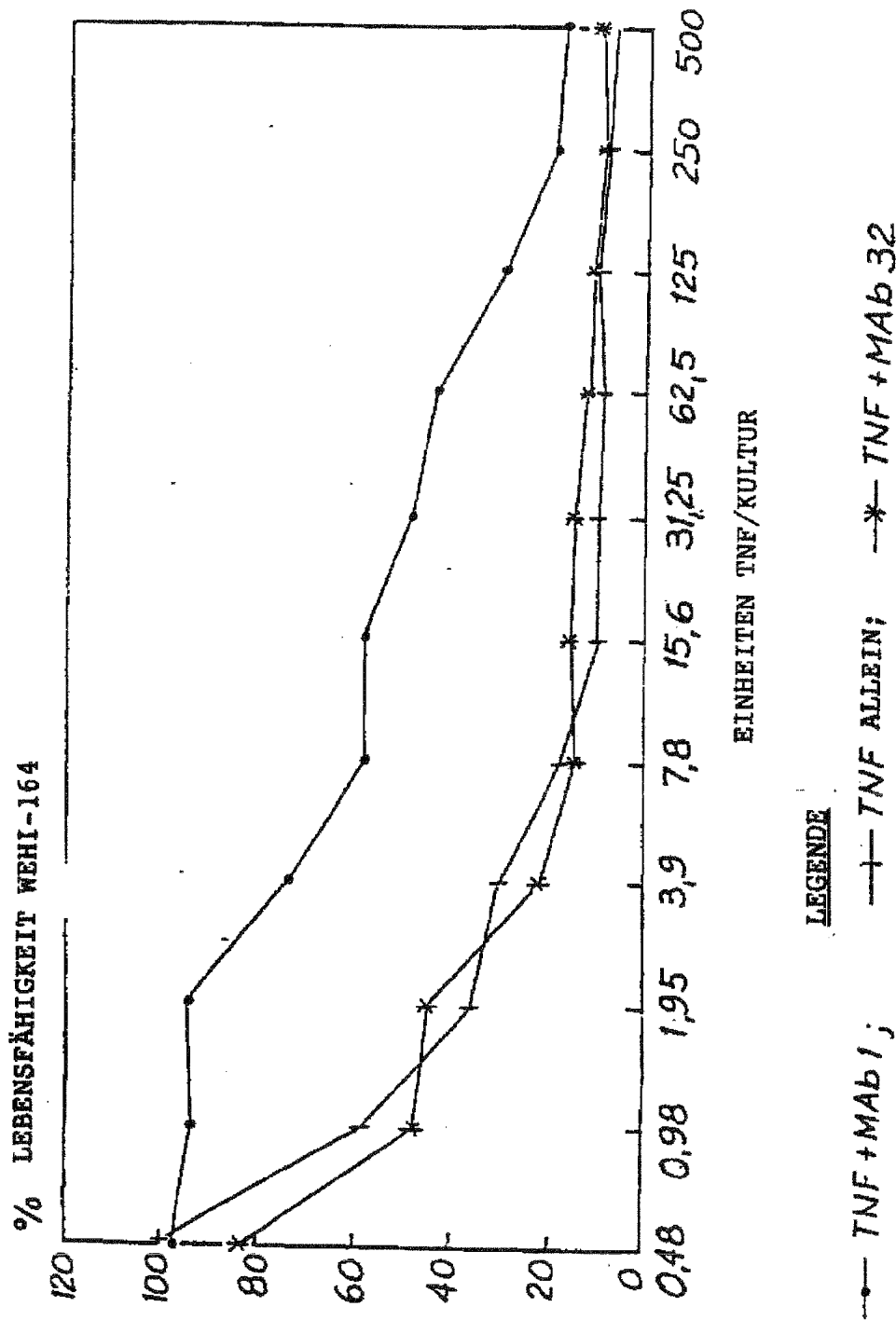


FIG. 2



MITTLERE LEBENSFÄHIGKEIT VON DREIFACHEN KULTUREN IN %

FIG. 3

4/33

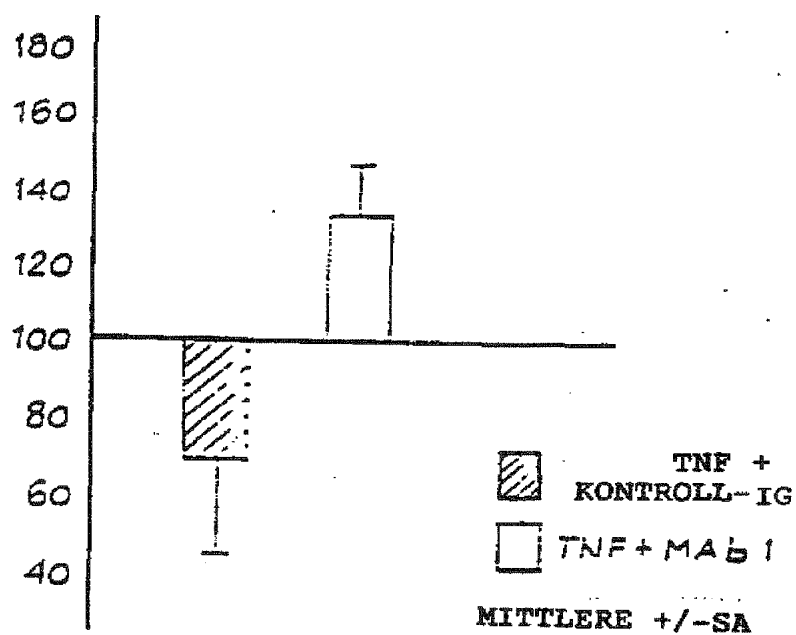
G
R
Ö
ß
E
N
Z
U
N
A
H
M
E
—
R
Ü
C
K
B
I
L
D
U
N
GVERÄNDERUNG
DER TUMOR-
GRÖßE IN %

FIG. 4

5/33

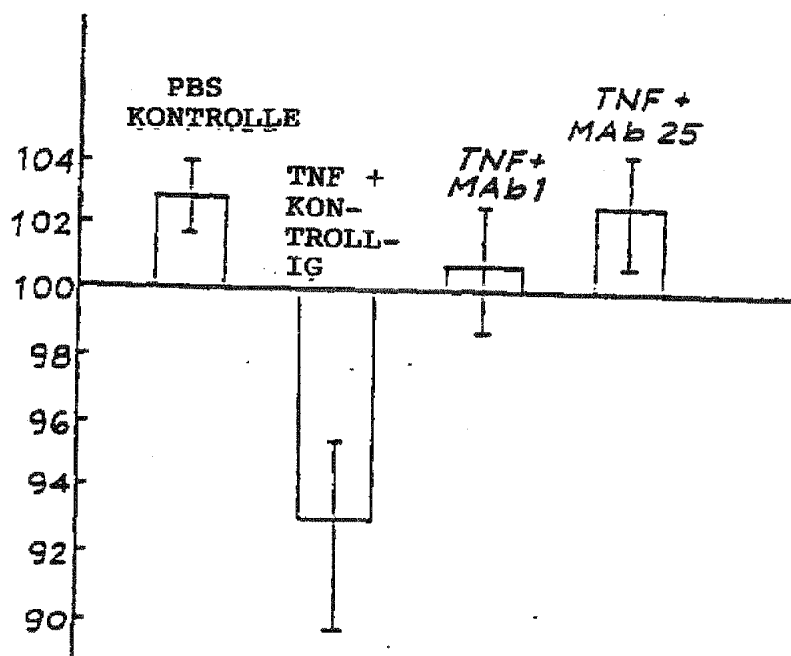
G
R
Ö
ß
E
N
Z
U
N
A
H
M
E
—
R
Ü
C
K
B
I
L
D
U
N
GVERÄNDERUNG
DER TUMOR-
GRÖßE IN %

FIG. 5

6/33

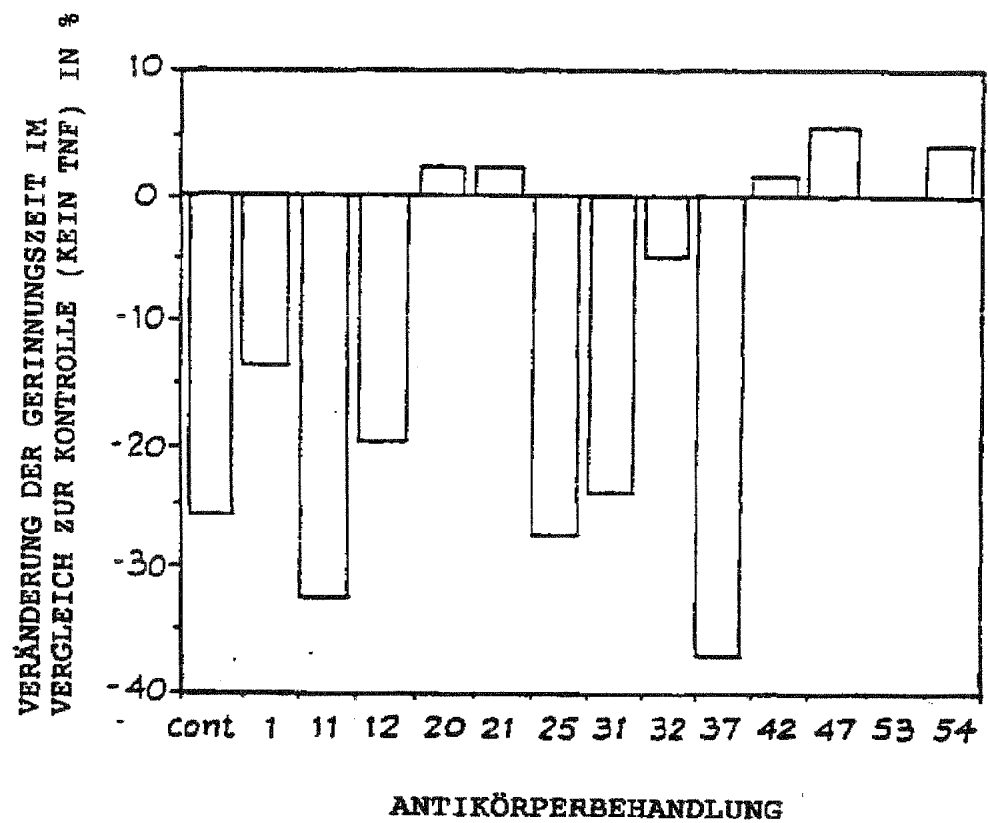


FIG. 6

03.04.01

EP 90911467.0

7/33

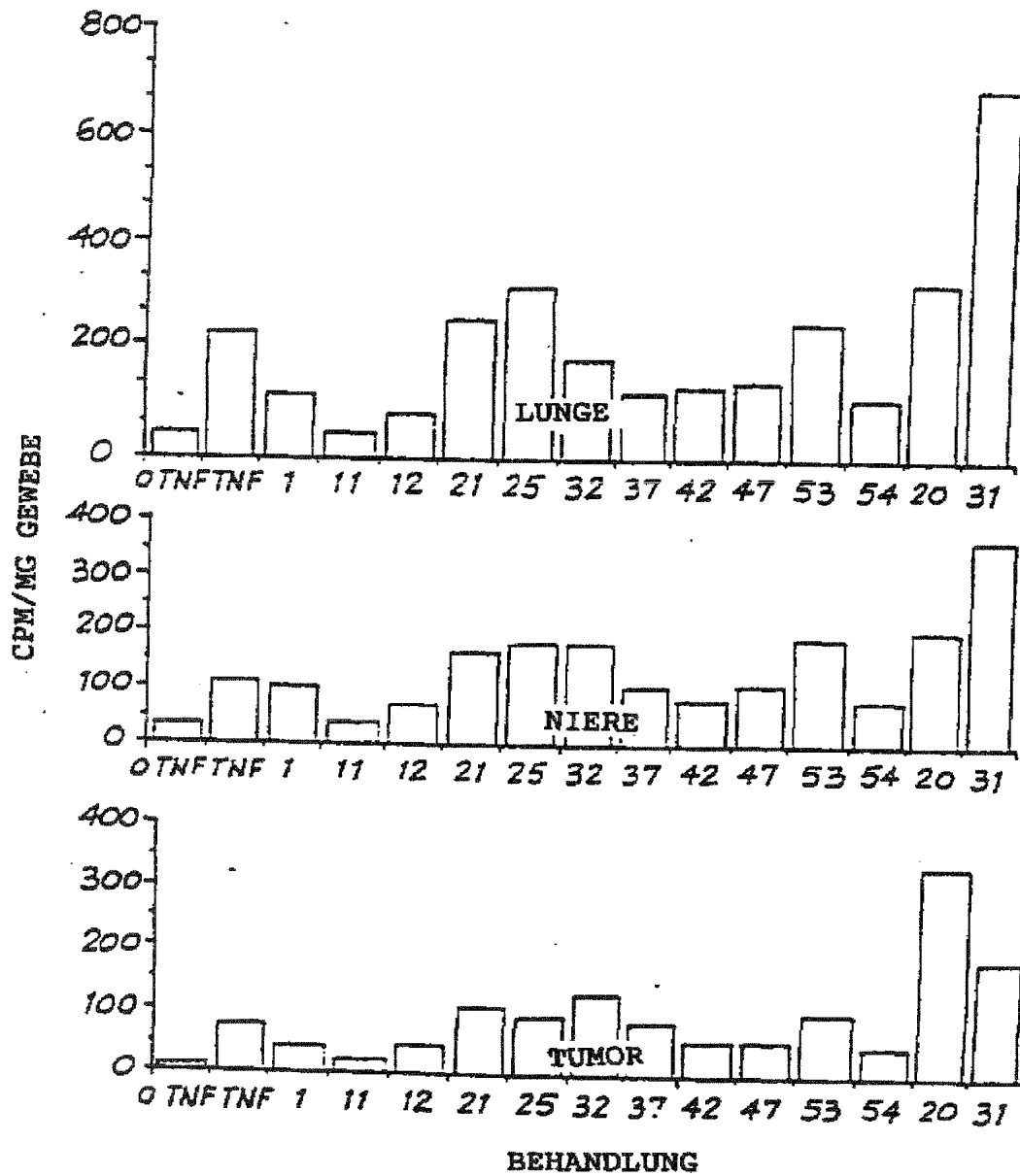


FIG. 7

8/33

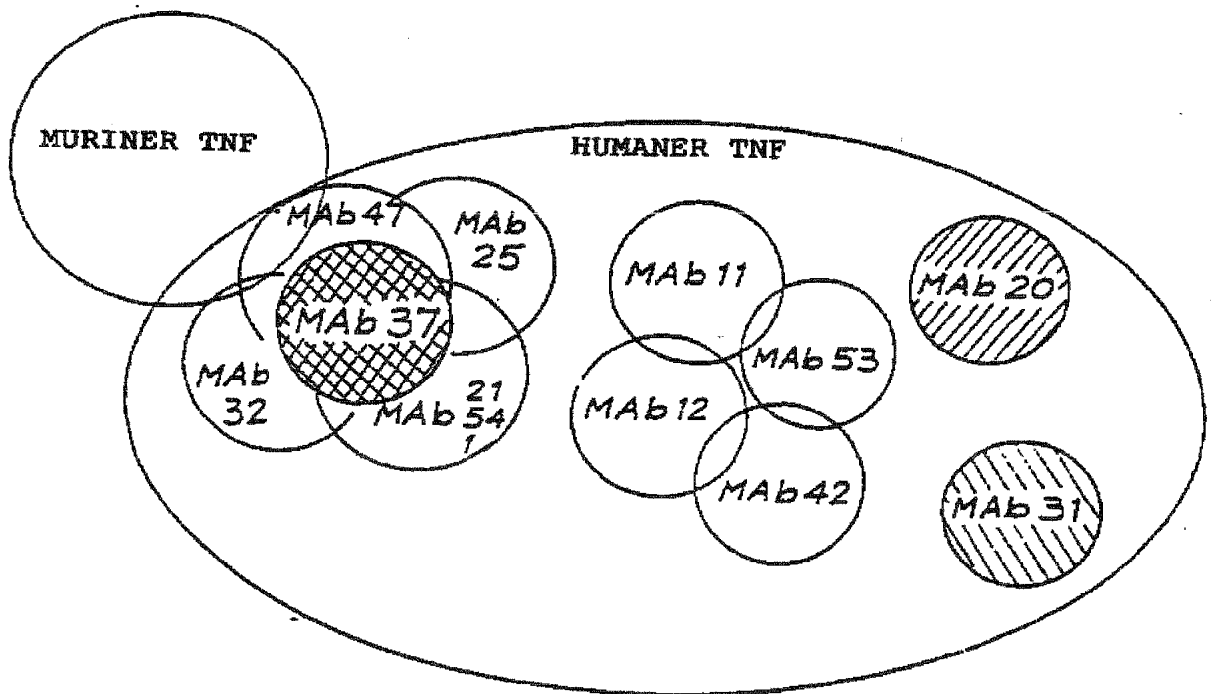


FIG. 8

9/33

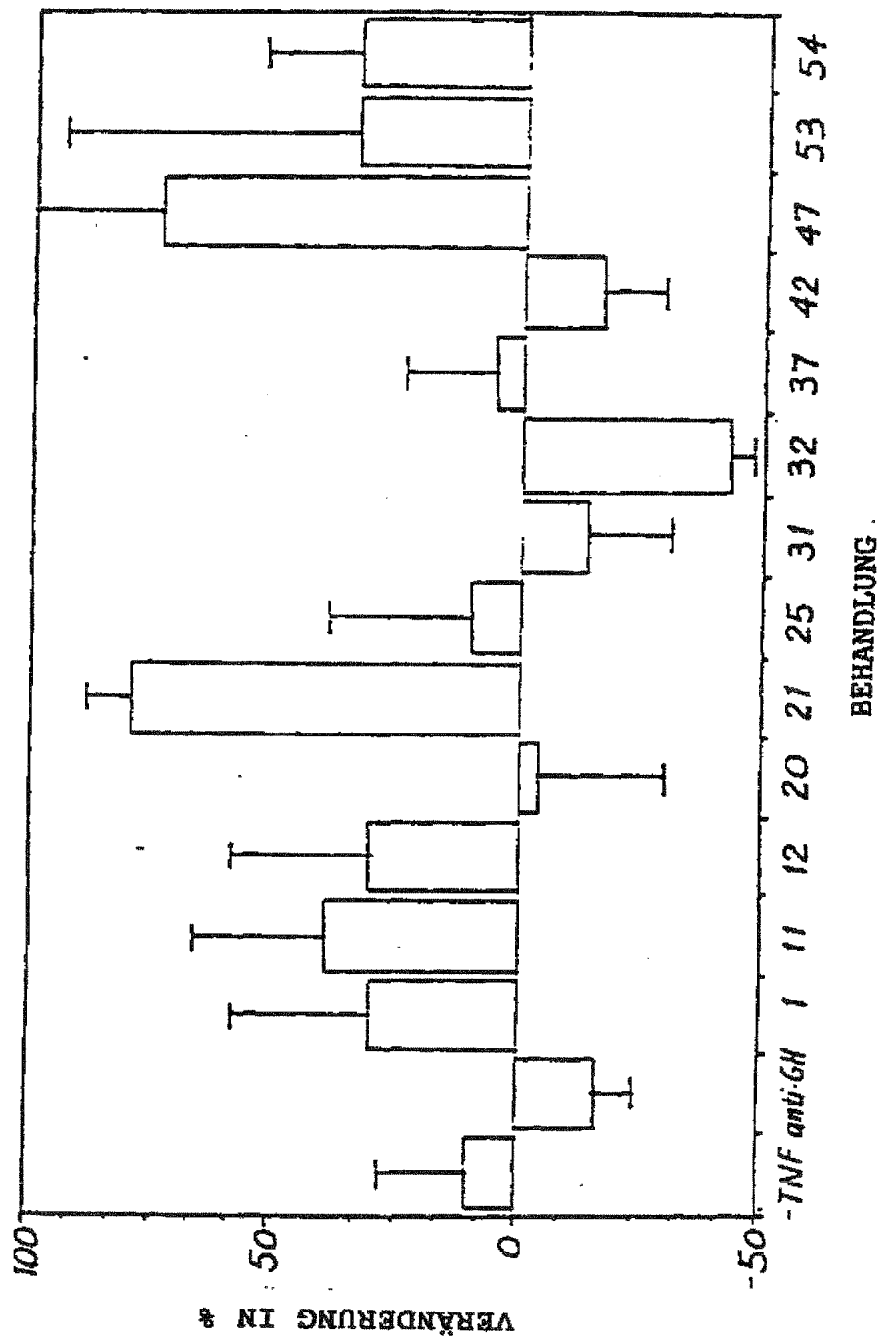
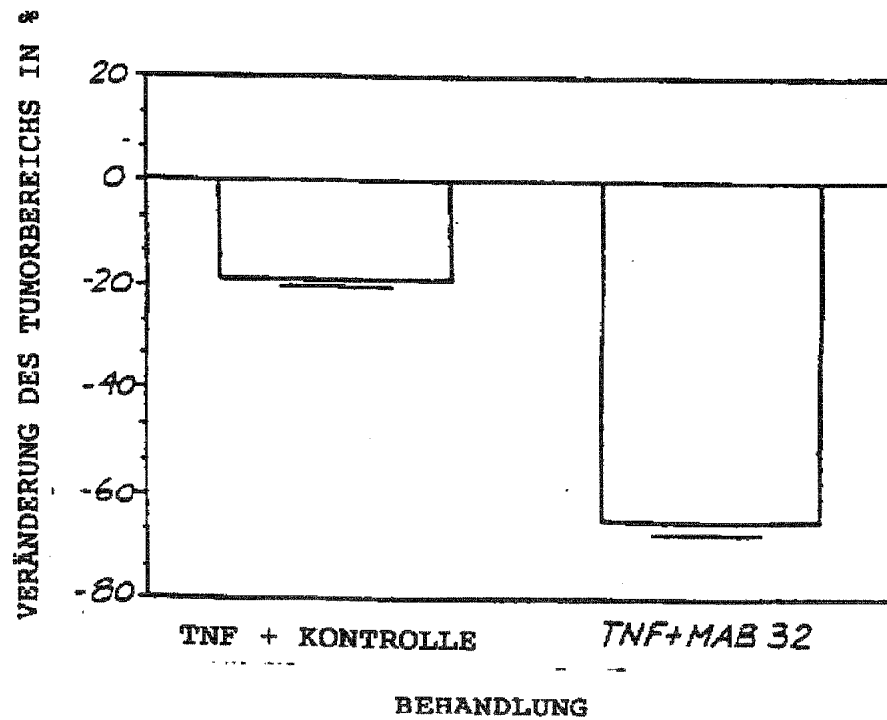
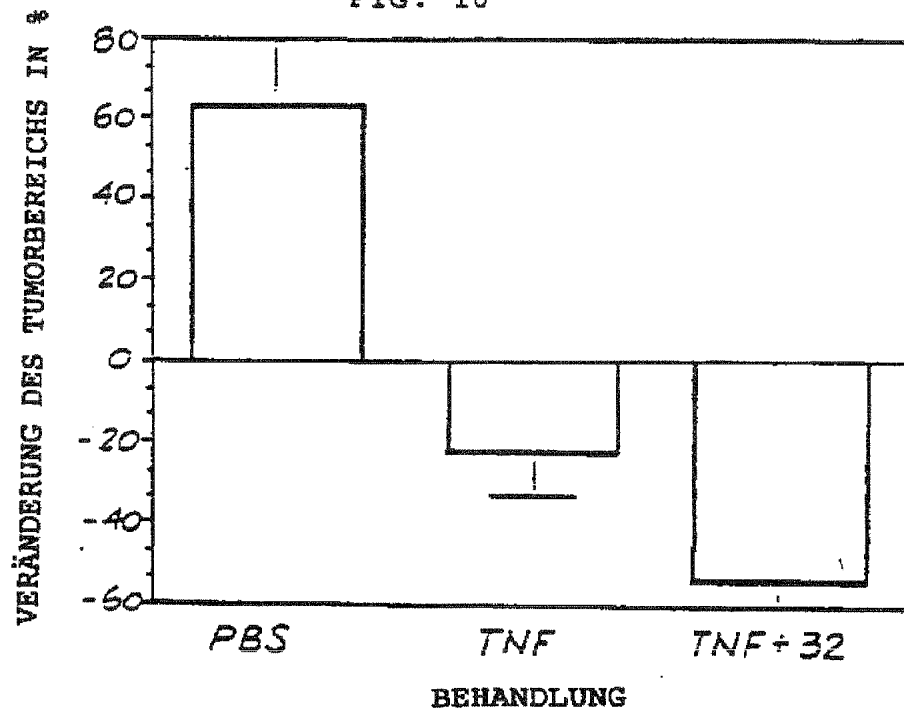


FIG. 9

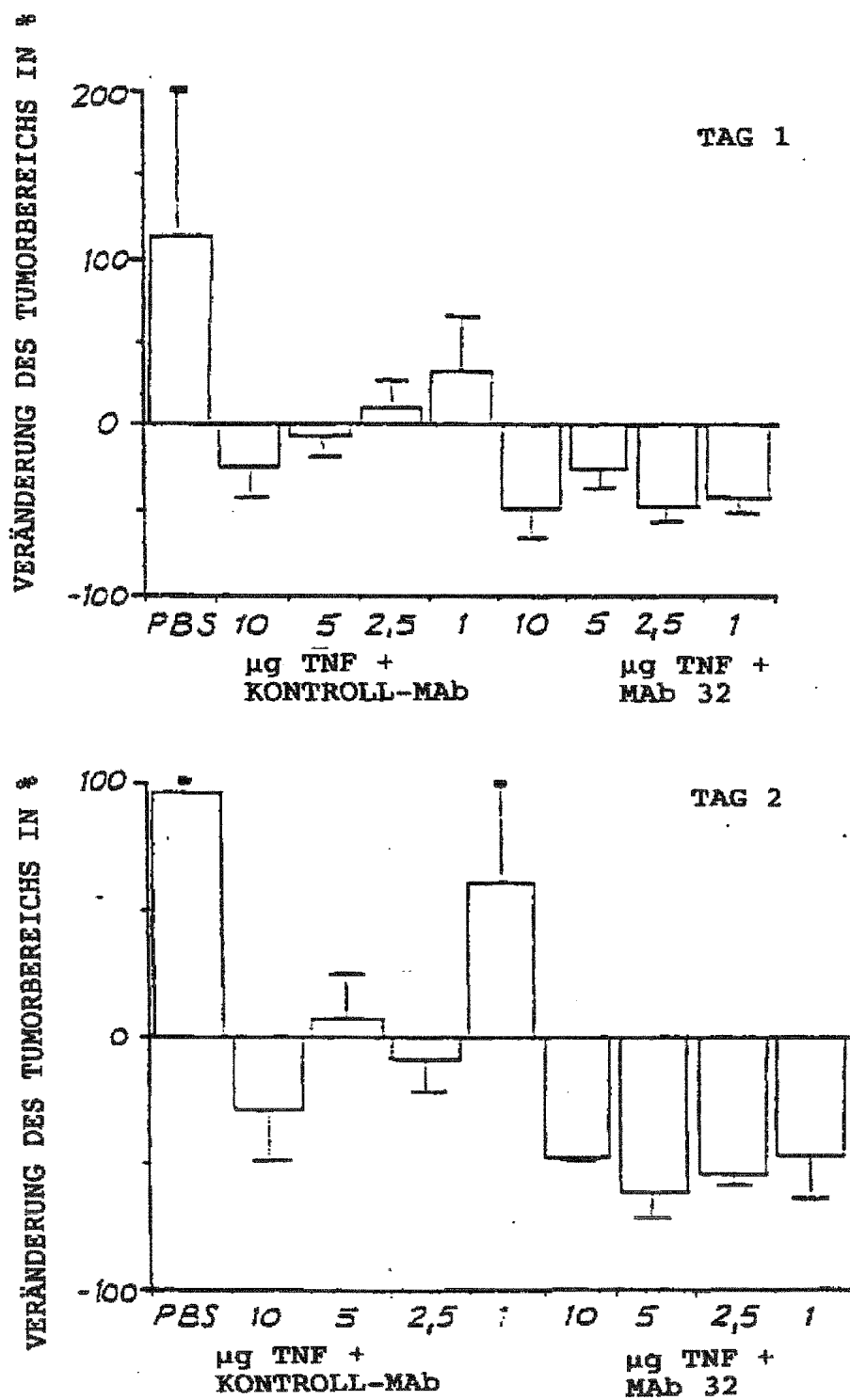
10/33

FIG. 10



11/33

FIG. 11



12/33

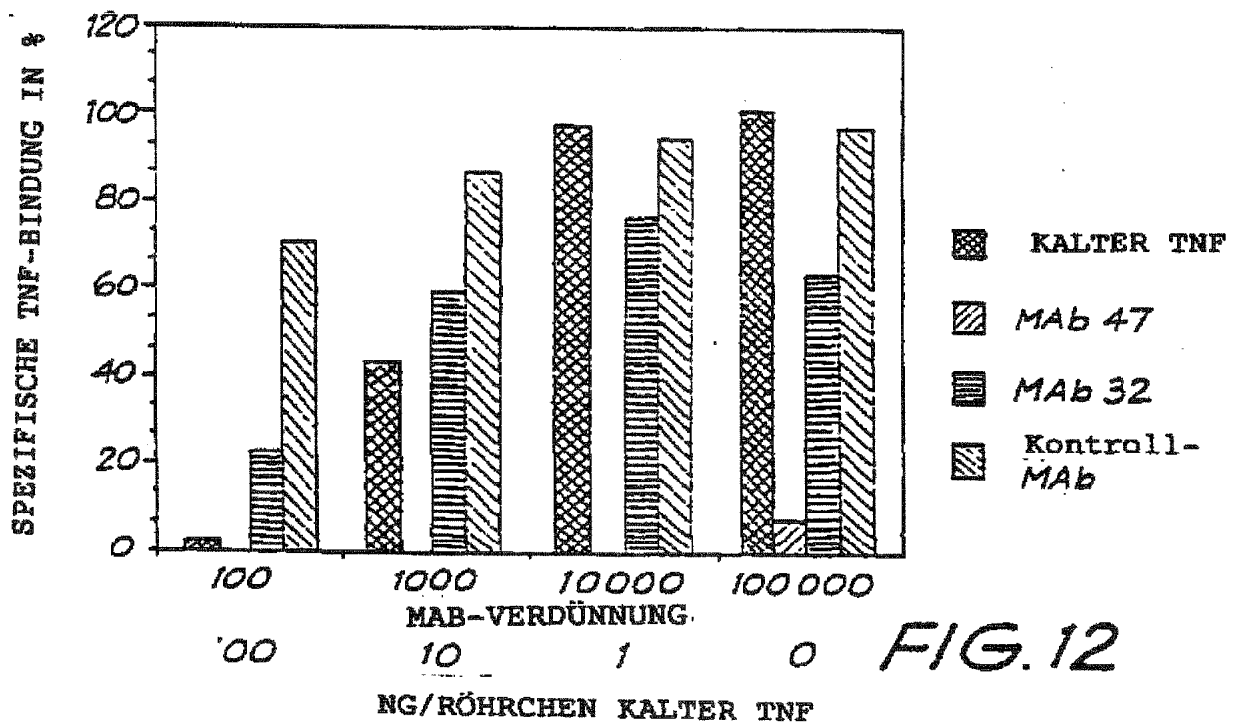


FIG. 12

13/33

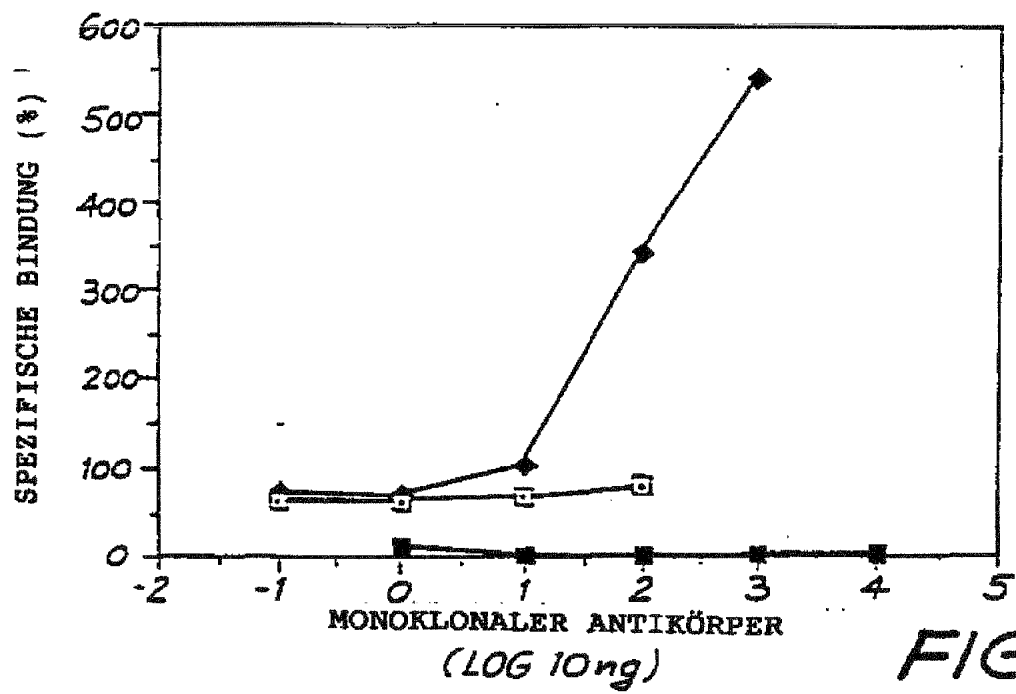
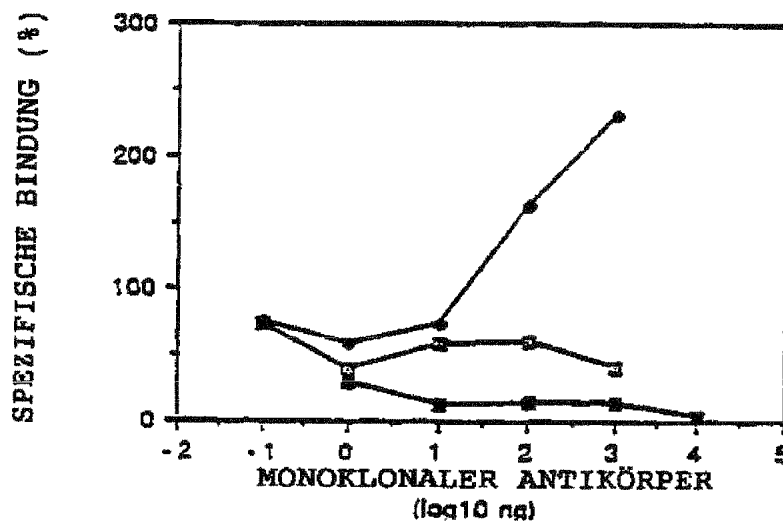


FIG.13

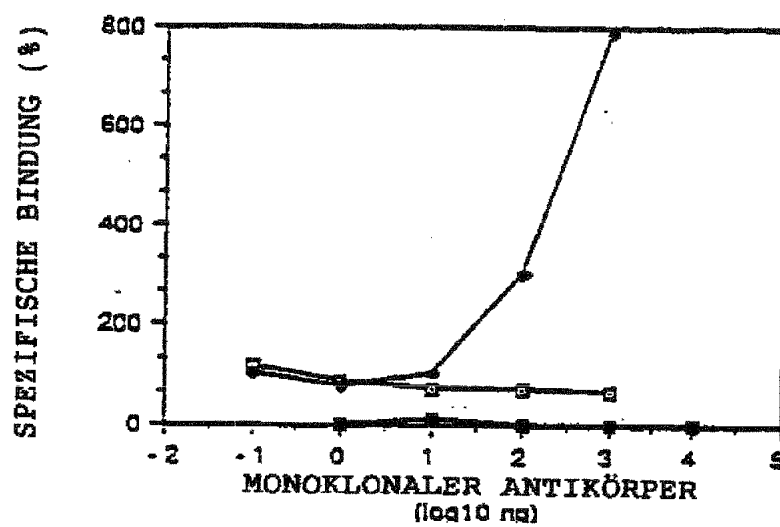
14/33

FIG. 14



15/33

FIG. 15

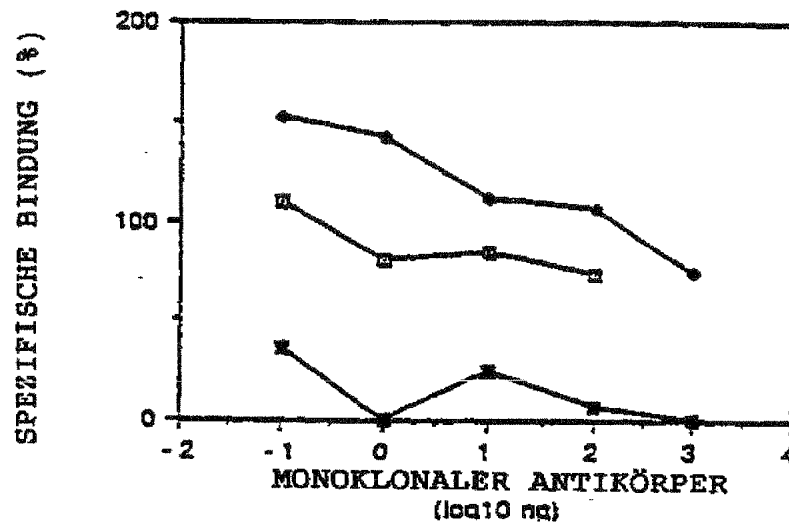


03.04.01

EP 90911467.0

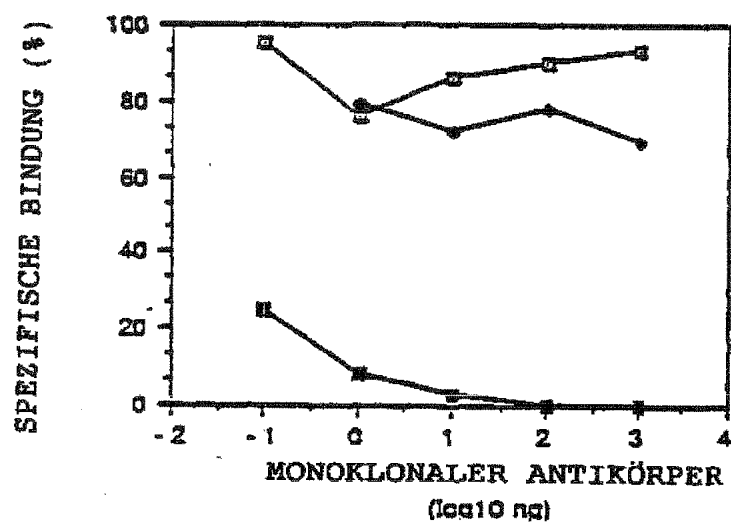
16/33

FIG. 16



17/33

FIG. 17



18/33

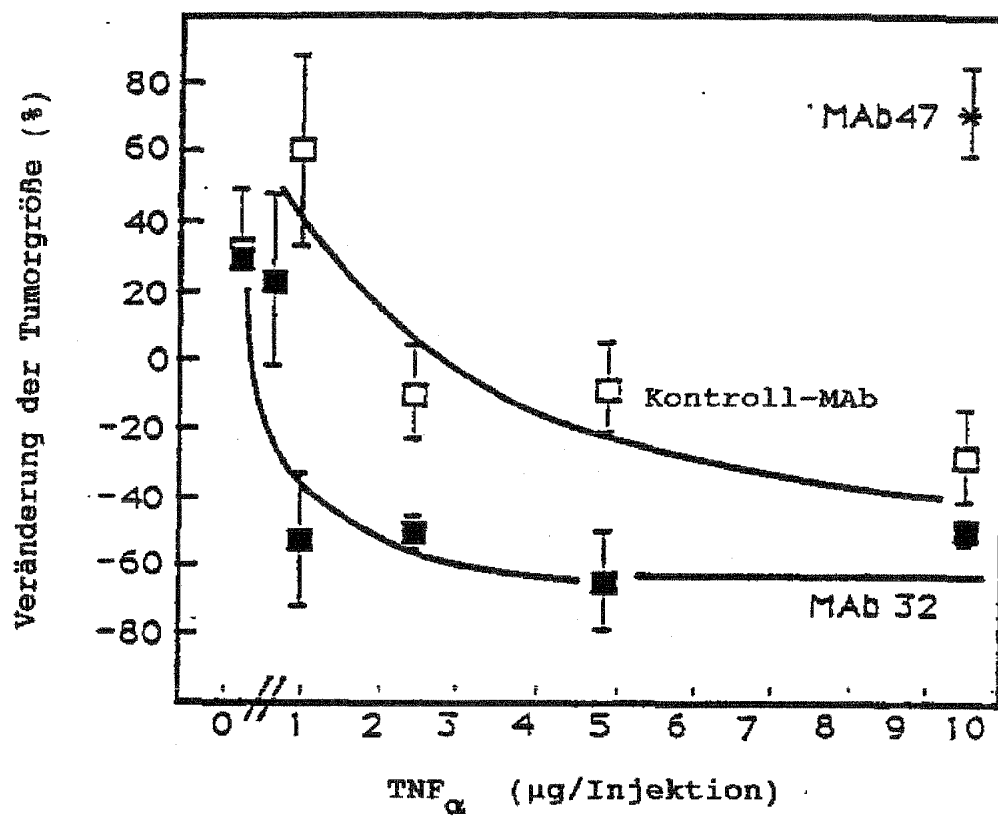
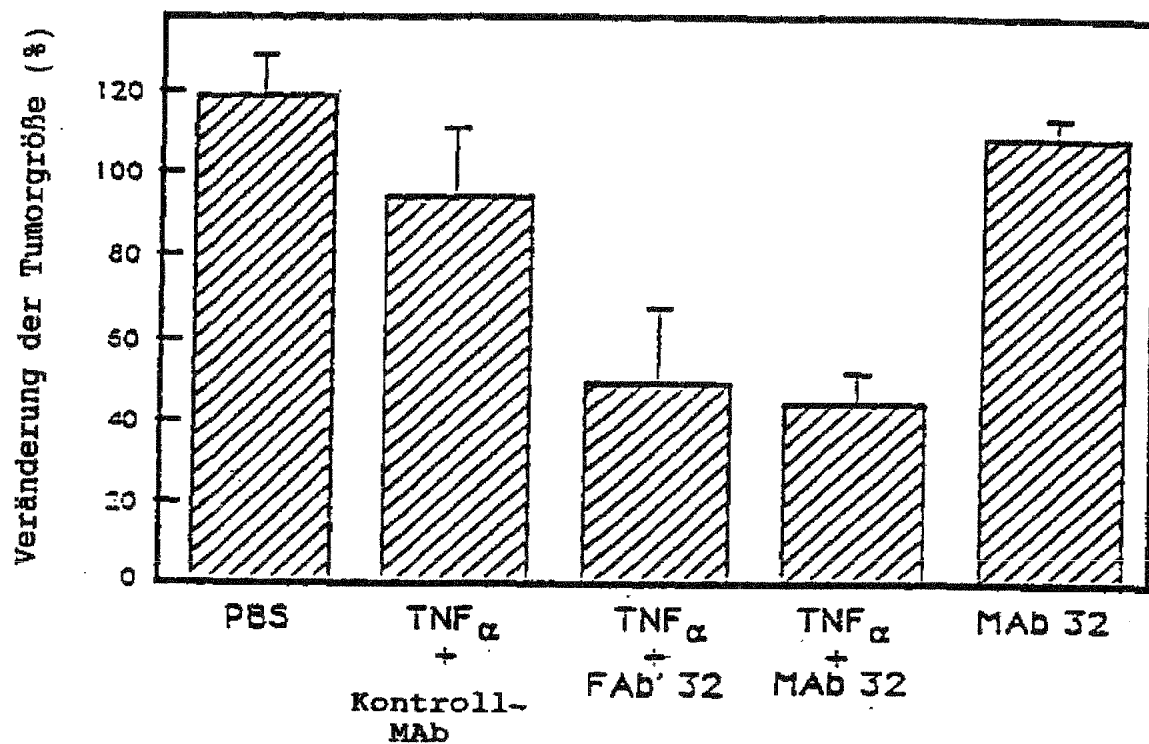


FIG. 18

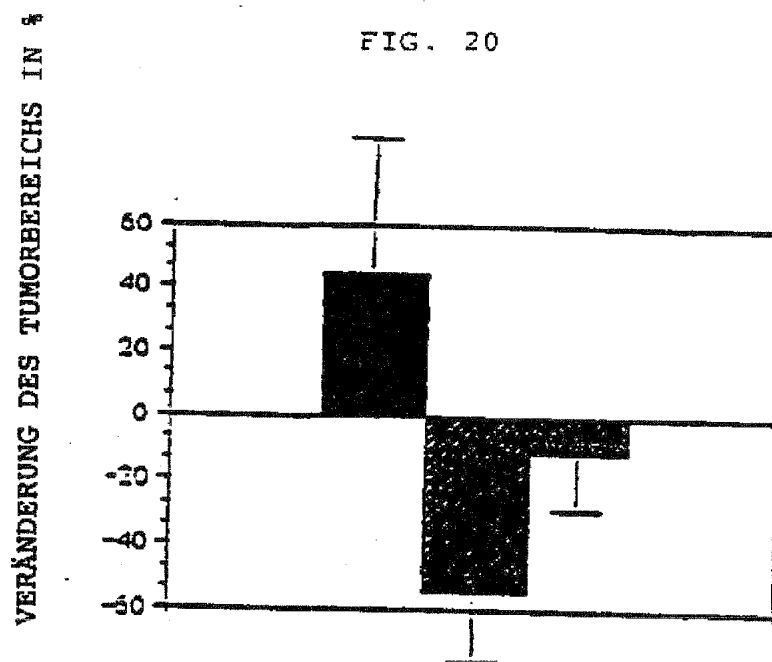
19/33

FIG. 19



20/33

FIG. 20

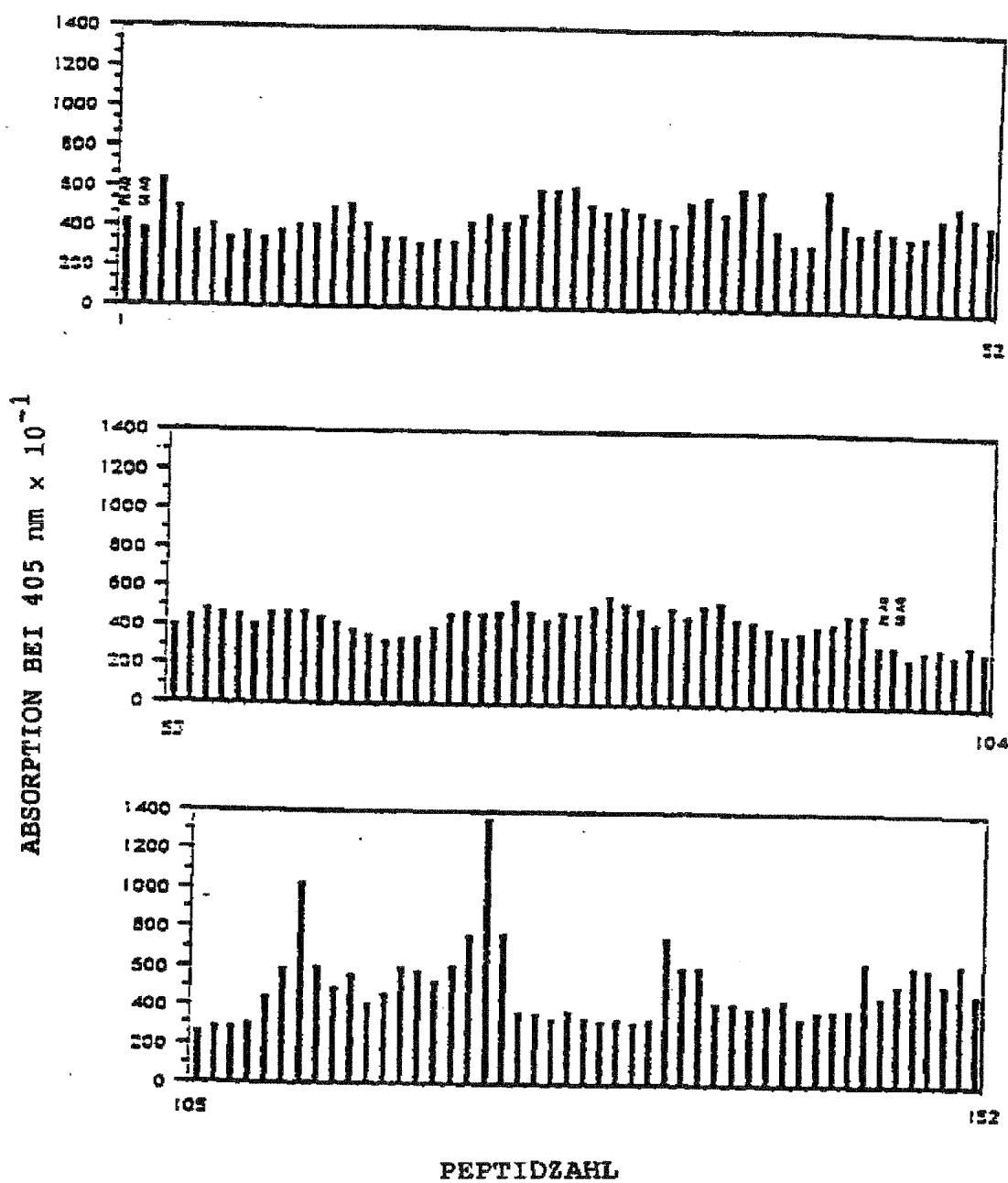


BEHANDLUNG
(200 µl Globuline + 10 µg TNF injiziert/Tag/Maus)

03.04.01

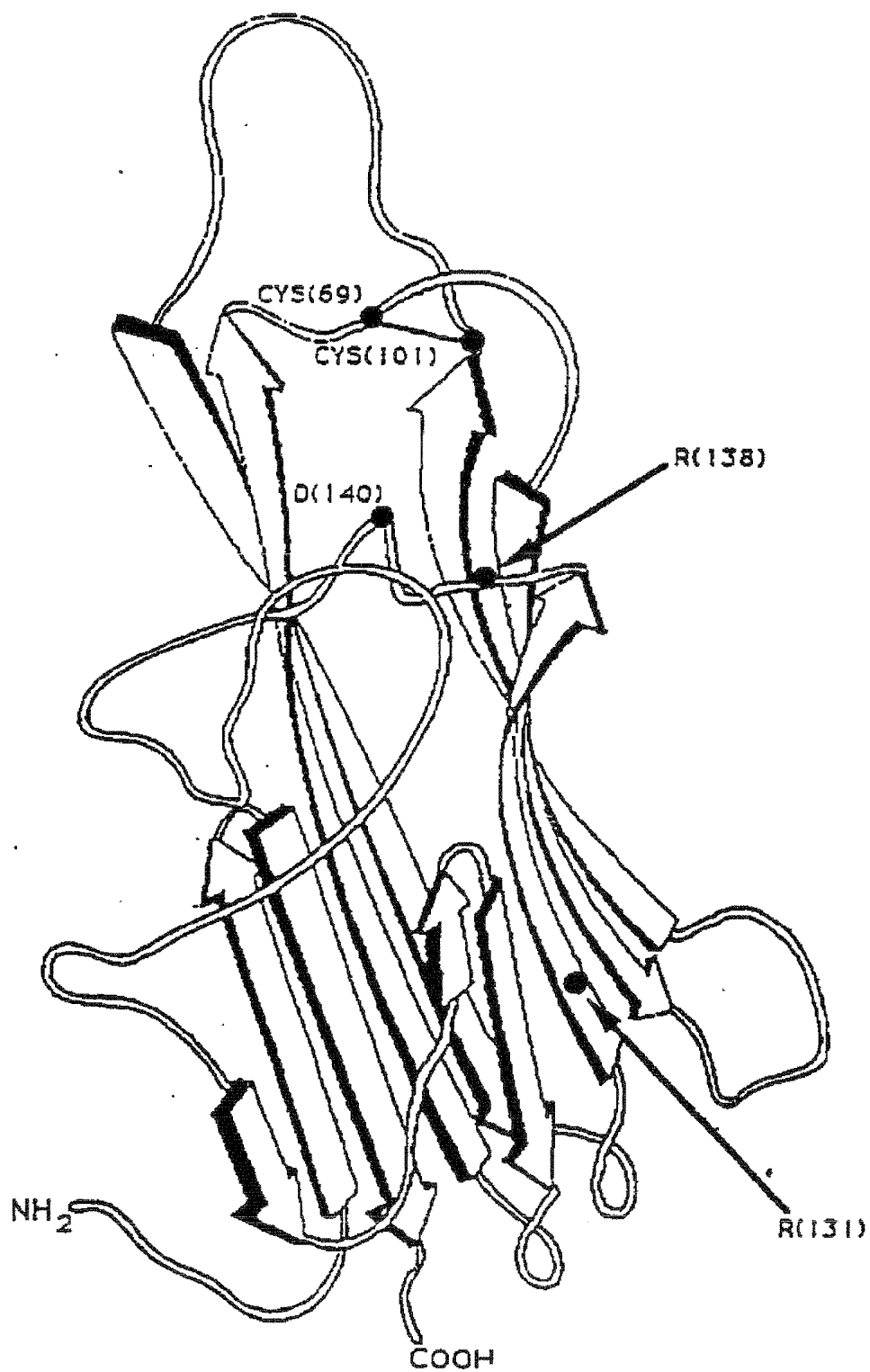
21/33

FIG. 21



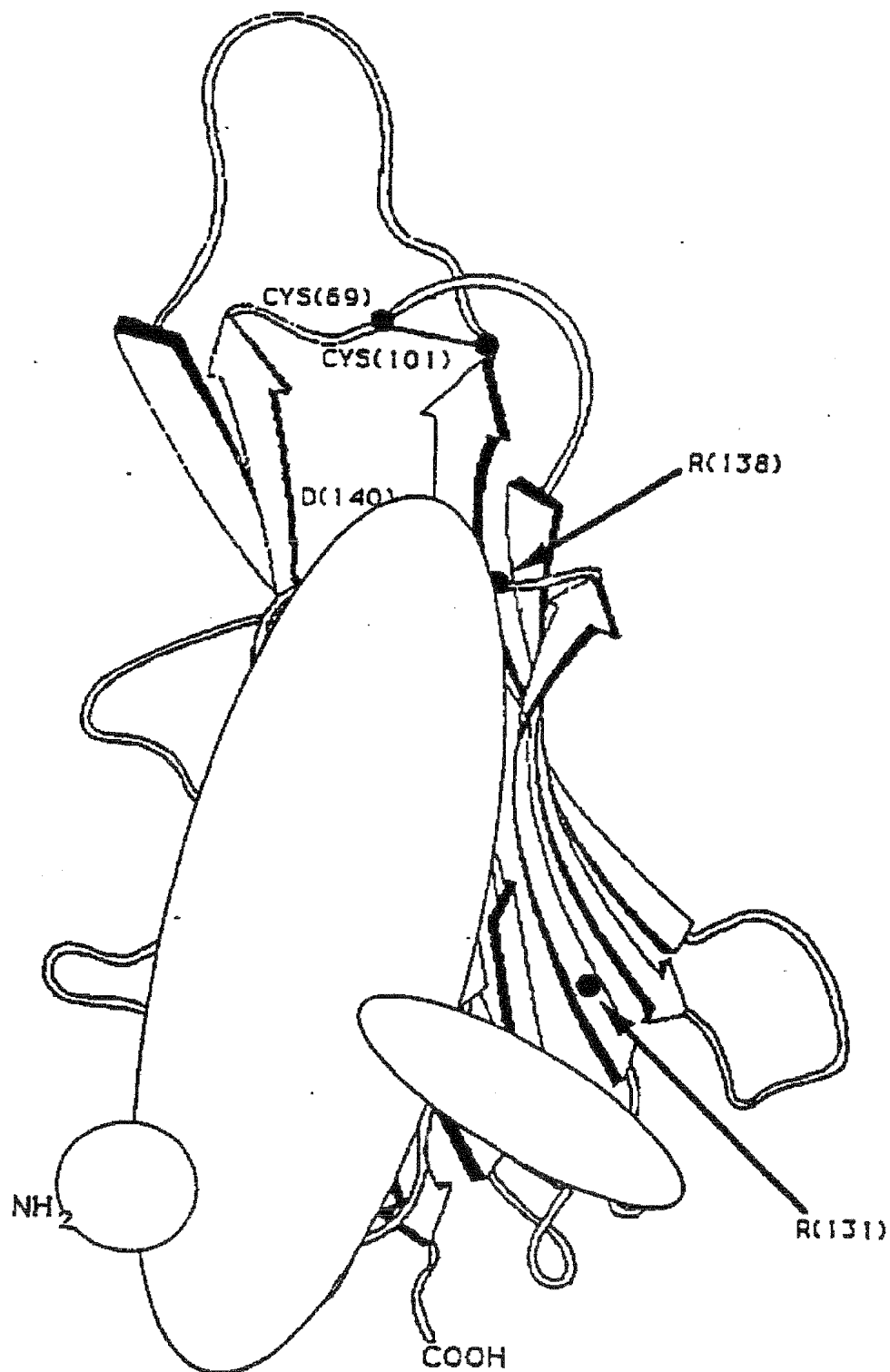
22/33

FIG. 22



23/33

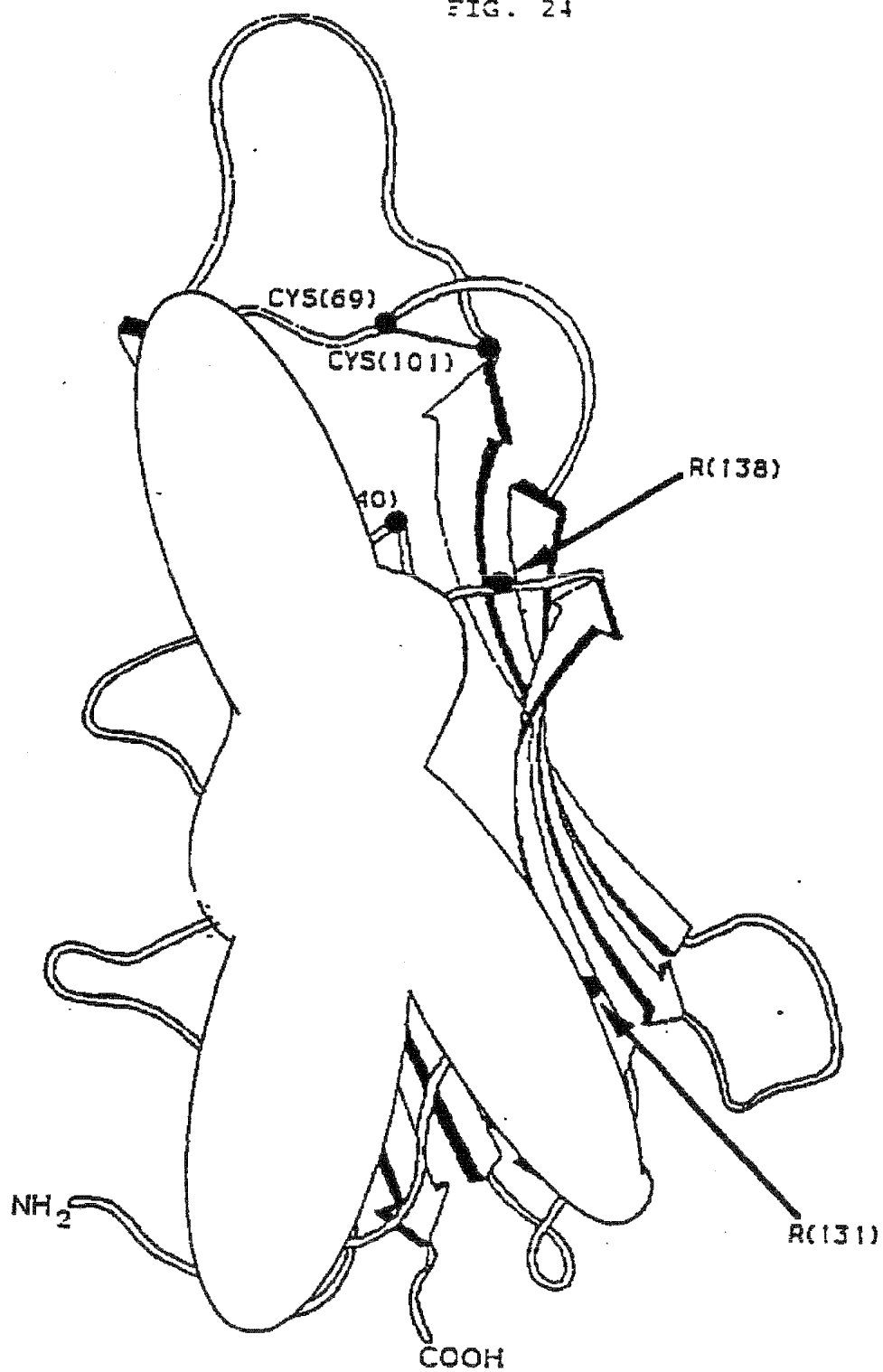
FIG. 23



7

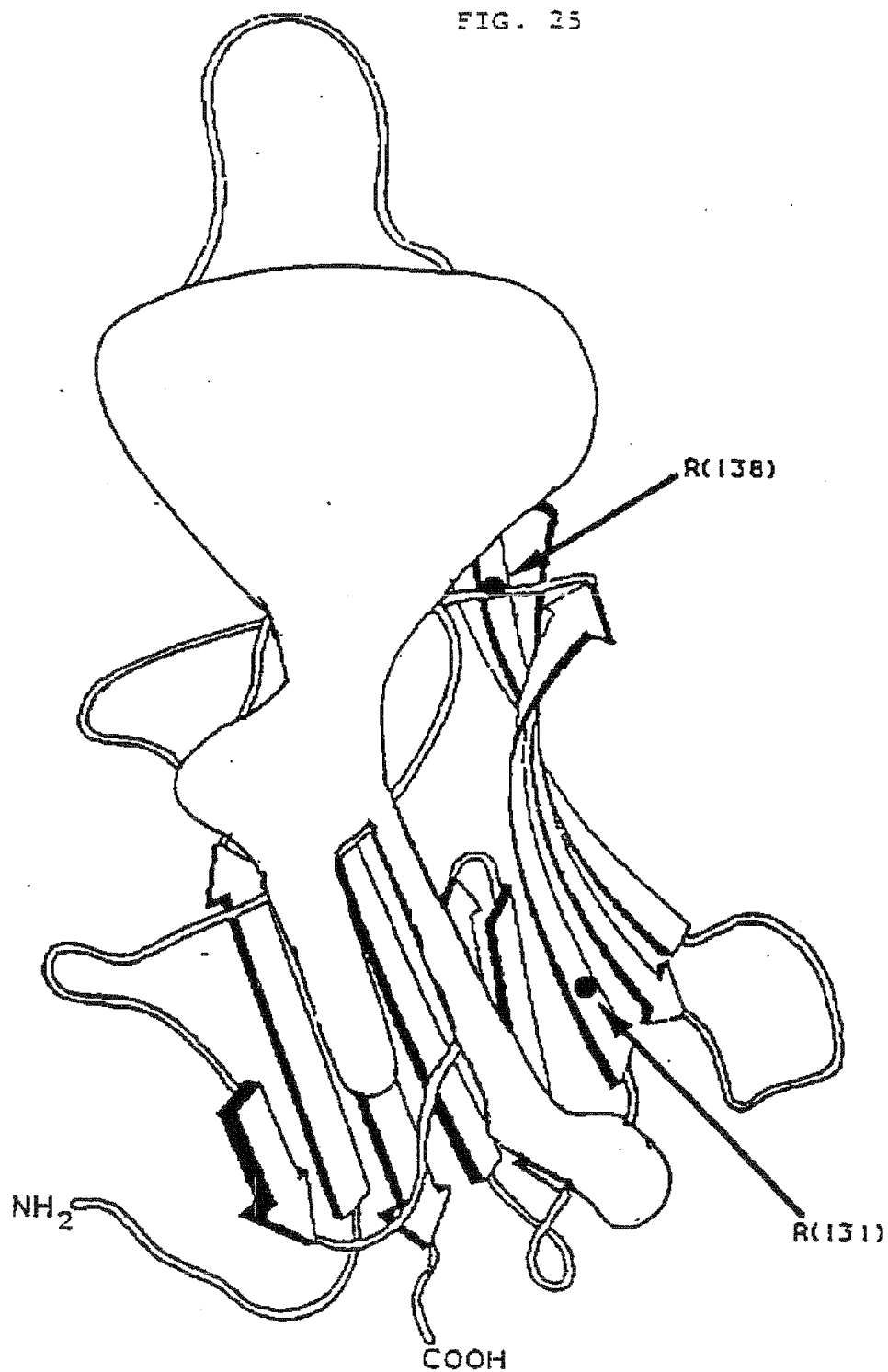
24/33

FIG. 24



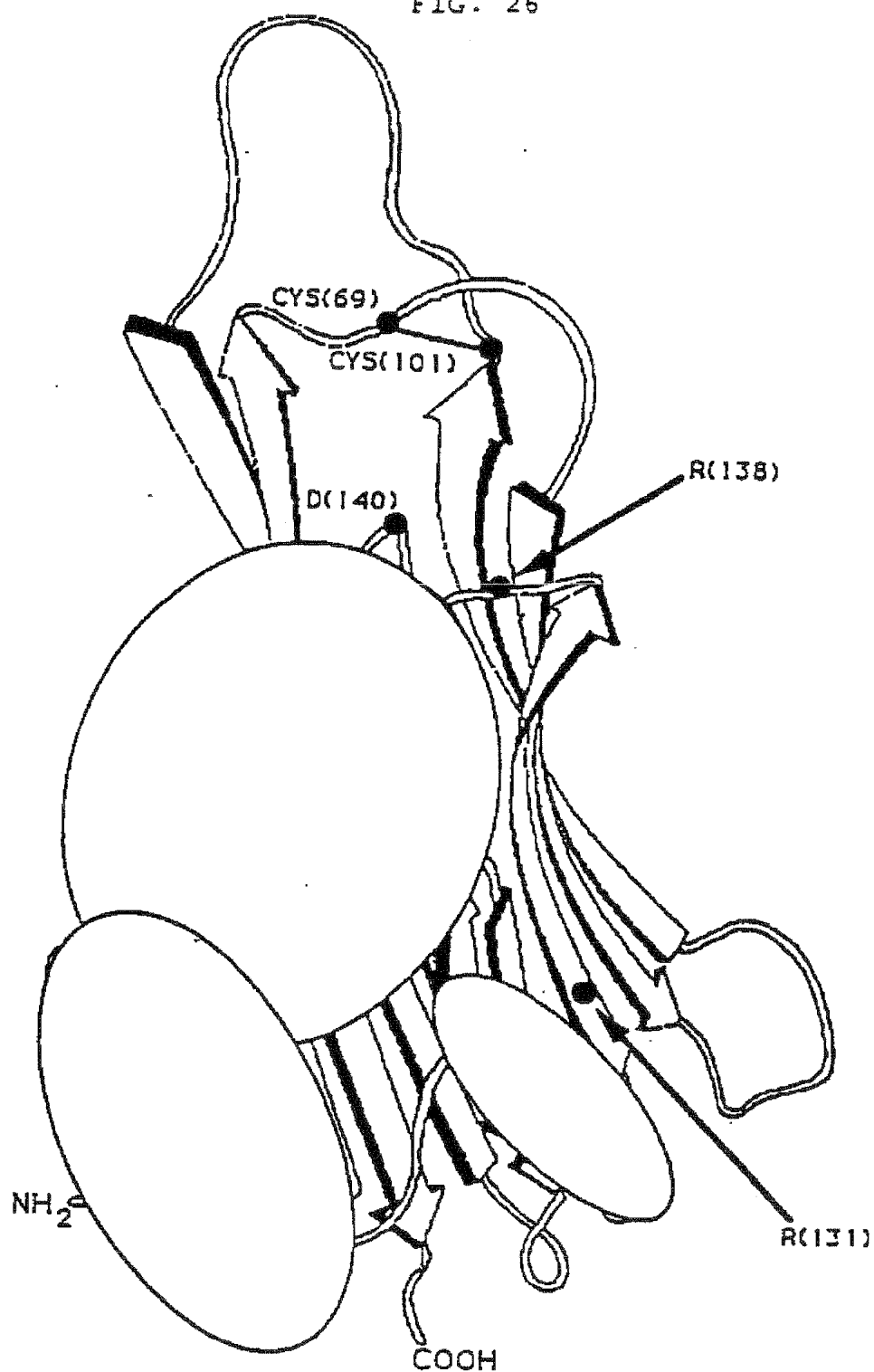
25/33

FIG. 25



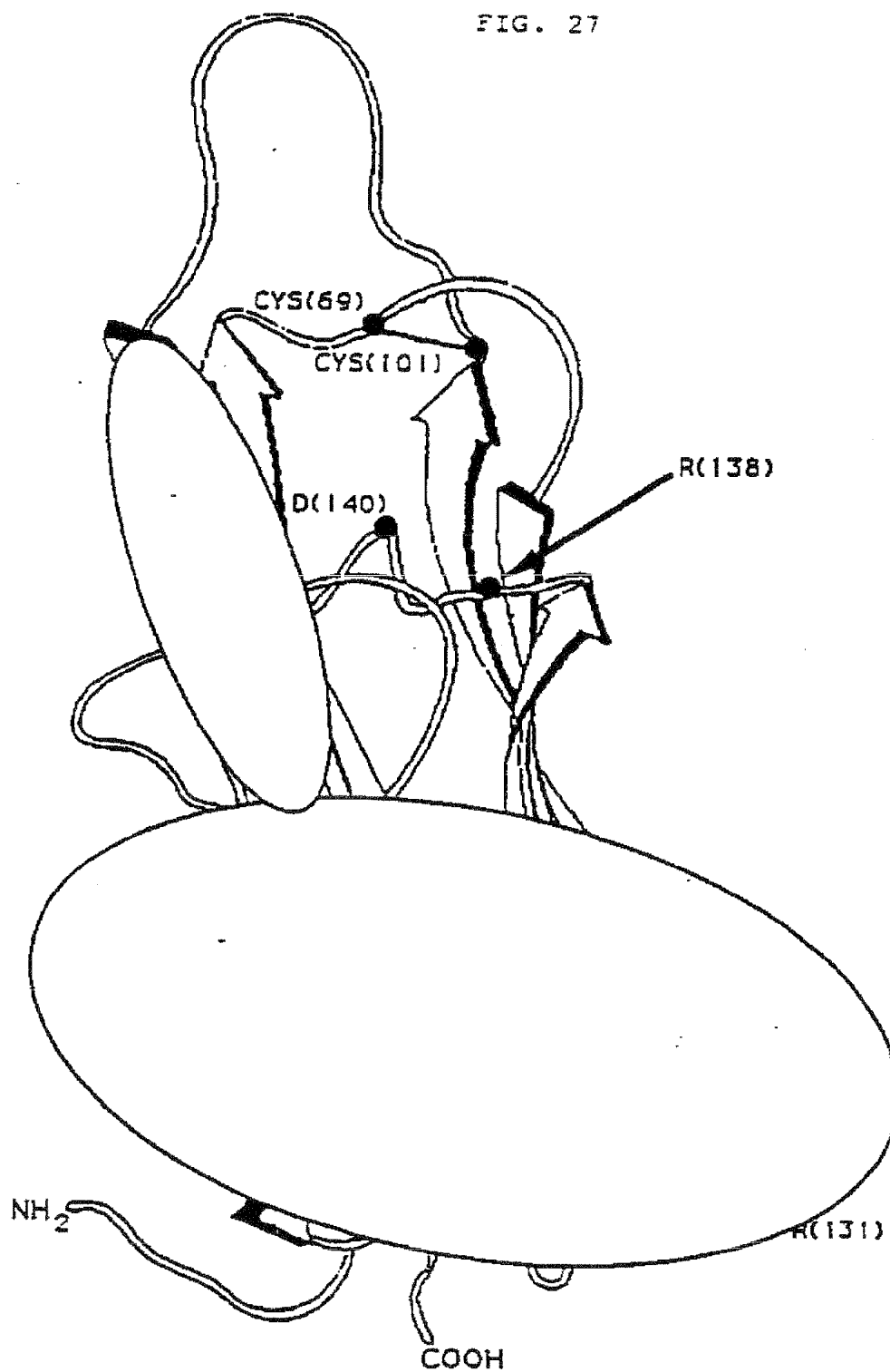
26/33

FIG. 26



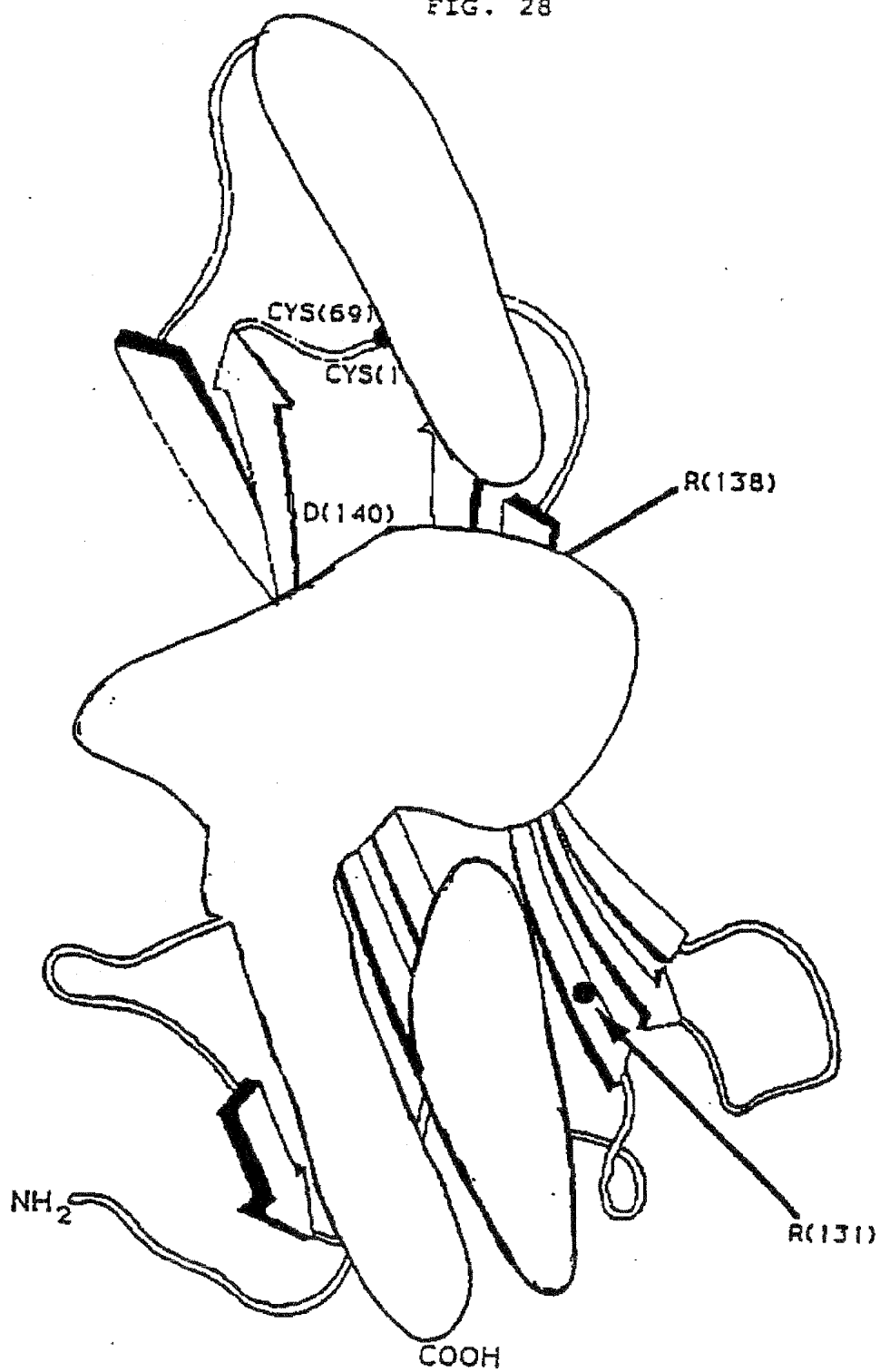
27/33

FIG. 27



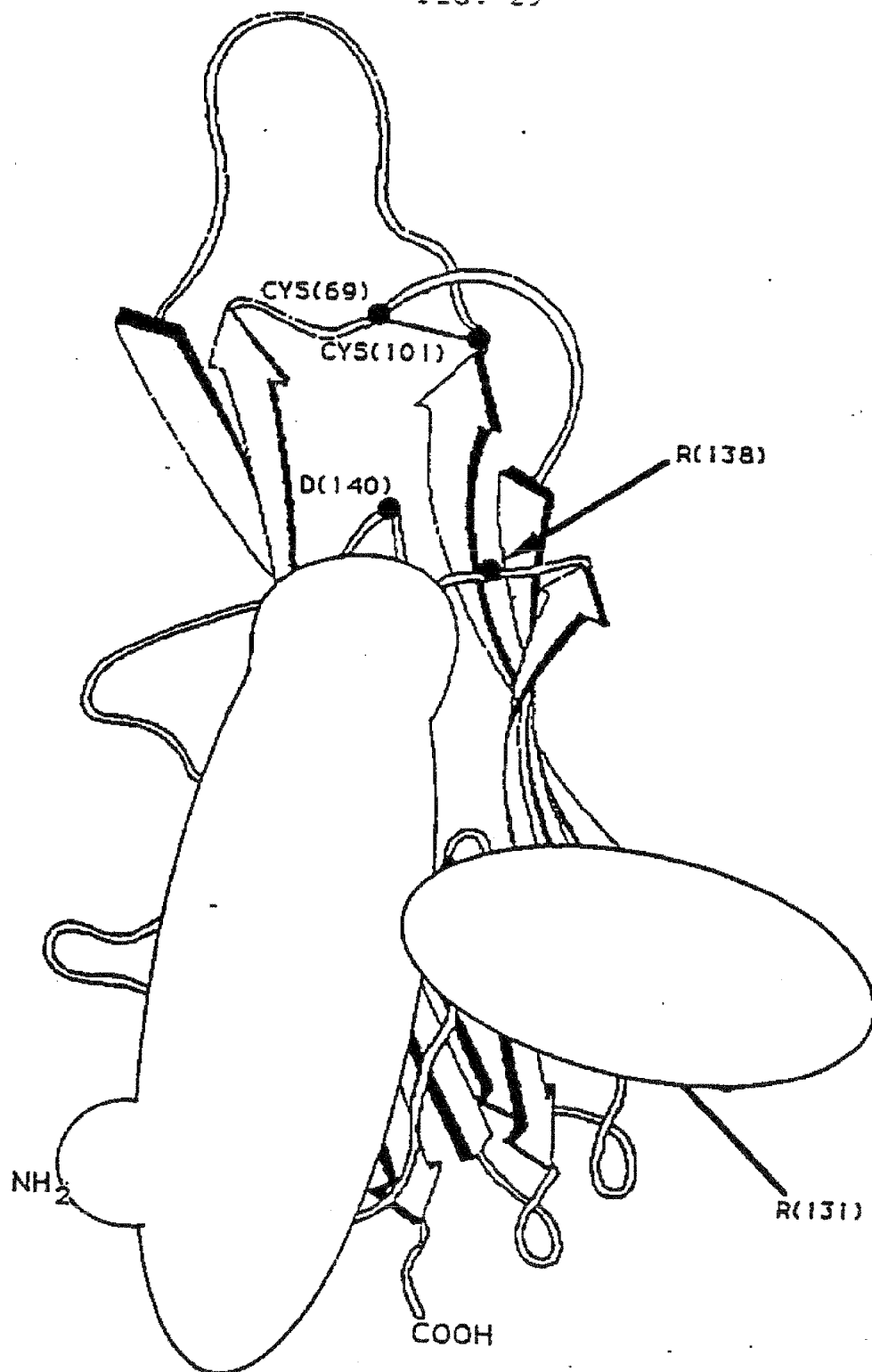
28/33

FIG. 28



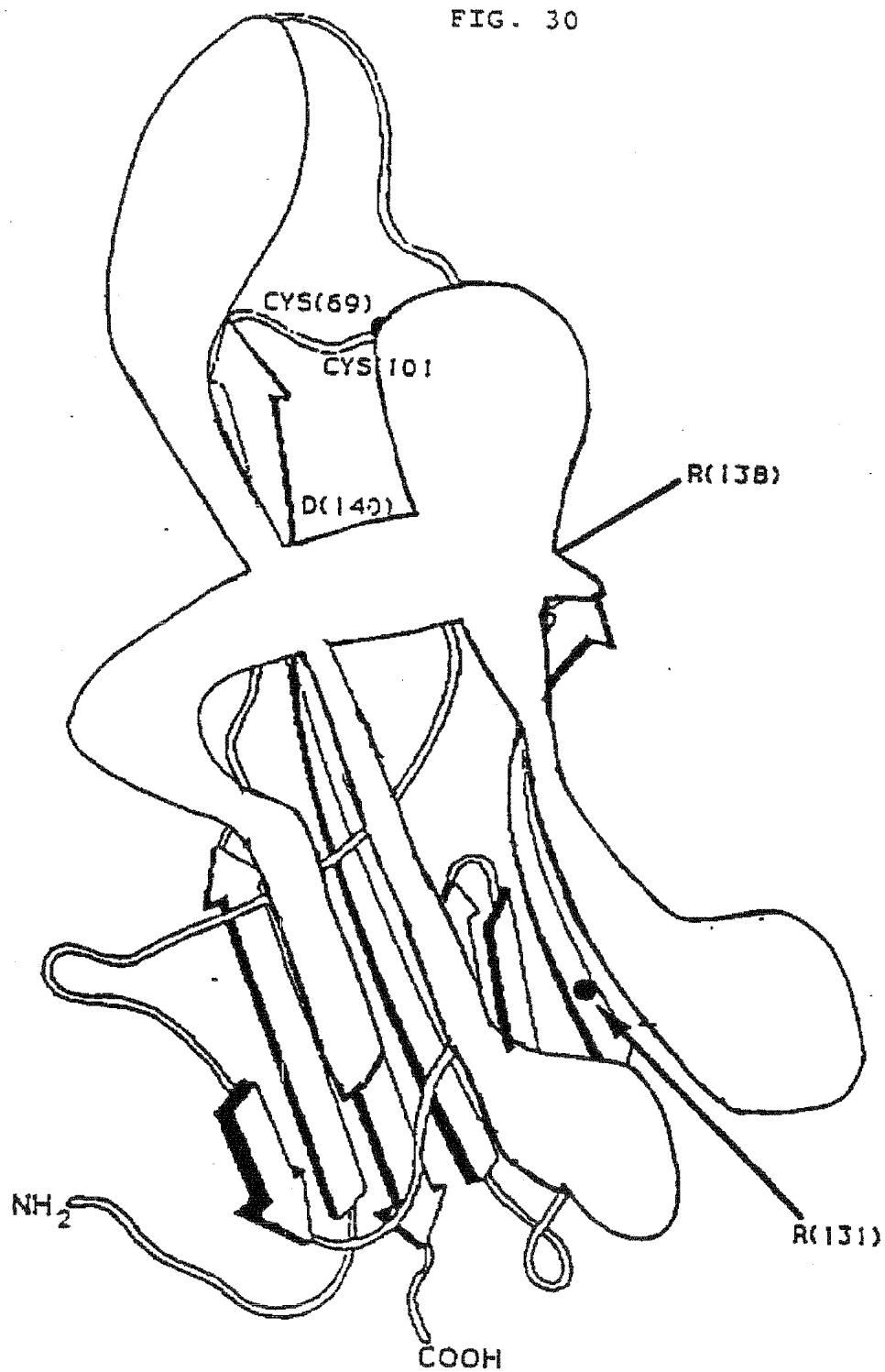
29/33

FIG. 29



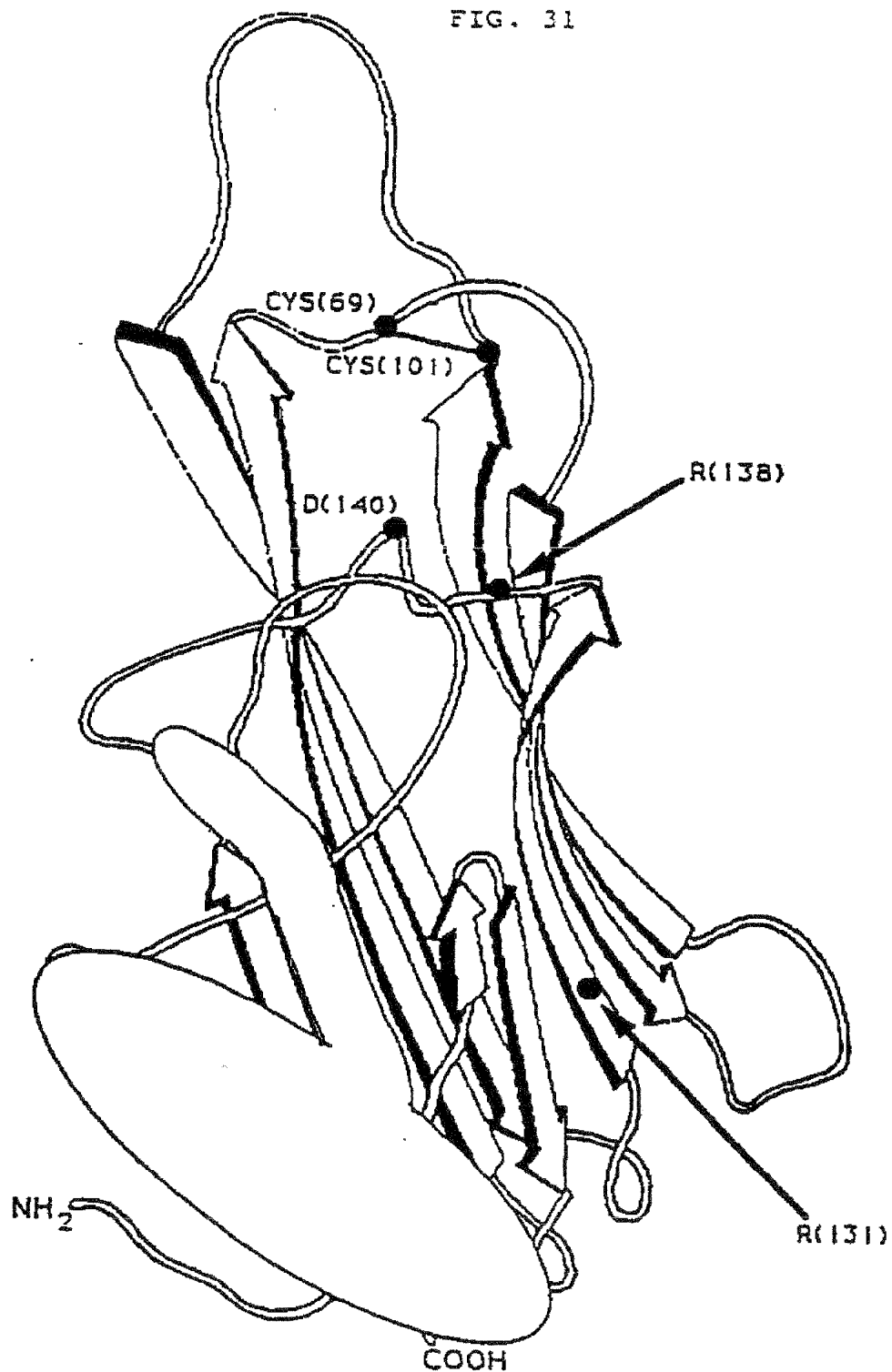
30/33

FIG. 30



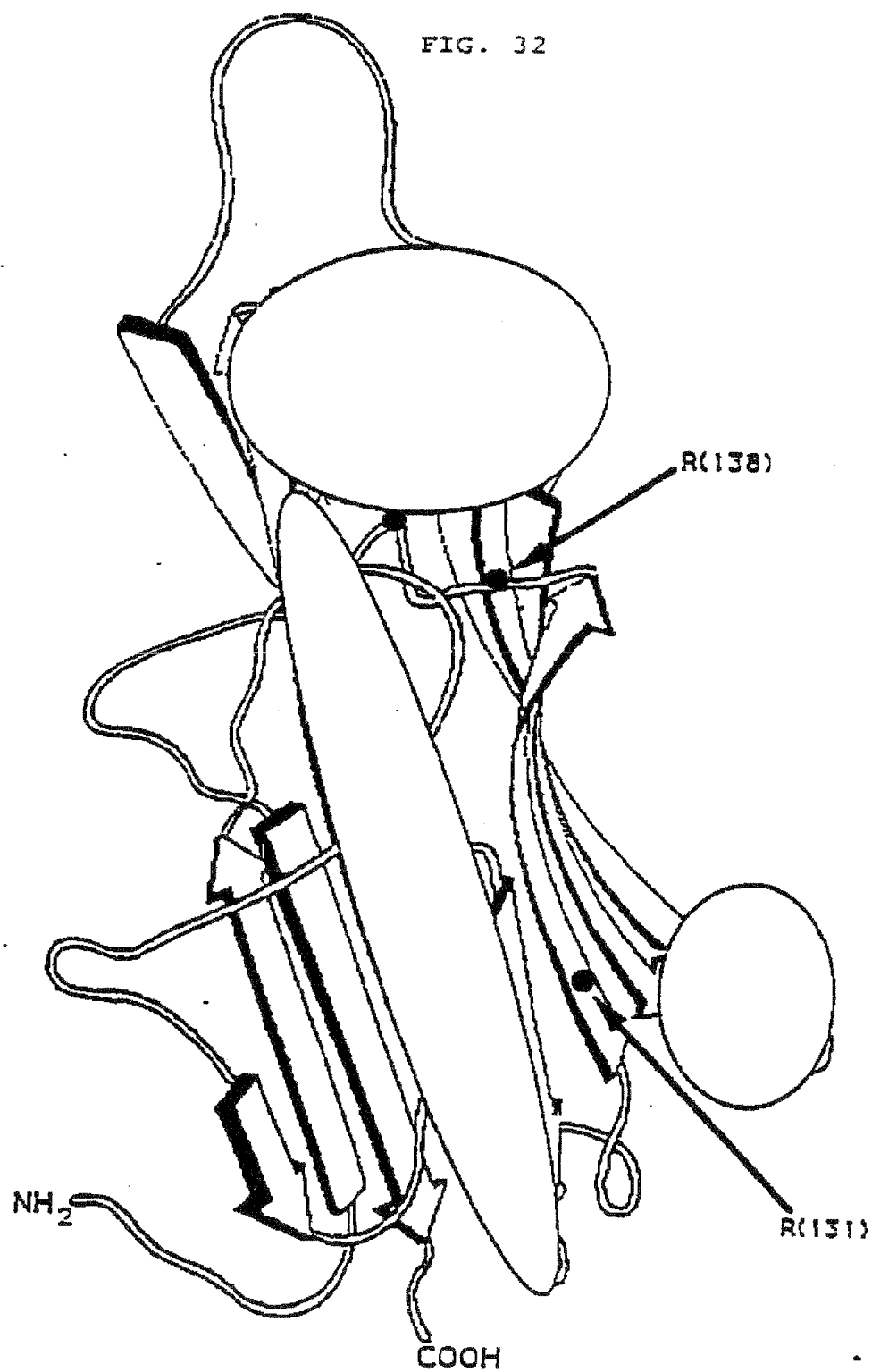
31/33

FIG. 31



32/33

FIG. 32



33/33

FIG. 33

